

特表平7-508881

第1部門第1区分

(43) 公表日 平成7年(1995)10月5日

(51) Int.Cl. ⁴	識別記号	序内整理番号	F I
C 1 2 P 24/02	Z N A C	9262-4 B	
C 1 2 N 1/19		8825-4 B	
9/90		9152-4 B	
15/09			
	9281-4 B	C 1 2 N 15/ 00	A
審査請求 未請求 予備審査請求 有 (全 37 頁) 最終頁に続く			
(31) 出願番号	特願平6-501587	(71) 出願人	メルク エンド カンパニー インコーポレーテッド アメリカ合衆国、ニュージャージー 07055、ローウエイ、イースト リンカー ン、ブヴェニエ 120
(35) (22) 出願日	平成5年(1993)6月2日	(71) 出願人	ユニバーシティー・オブ・セント・アツト・カンタベリー イギリス国、セント・シー・ティー・2・7・エヌ・ゼット、カンタベリー、ザ・レジストリー (皆地なし)
(35) 翻訳文提出日	平成6年(1994)12月12日	(74) 代理人	弁理士 川口 親雄 (外2名)
(36) 国際出願番号	P C T / U S 9 3 / 0 5 3 1 8		
(37) 国際公開番号	W O 9 3 / 2 5 6 7 6		
(37) 国際公開日	平成5年(1993)12月23日		
(31) 優先権主張番号	9 0 1 , 7 1 3		
(32) 優先日	1992年6月12日		
(33) 優先権主張国	米国 (US)		

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 サッカロミセスセレビシアエによるジスルフィド結合をもつ組織タンパク質の産生を増加させる方法

(57) 【要約】

酵母によって産生されるジスルフィド結合をもつ組織タンパク質、特に組織タンパク質の産生を増加させる方法を開示する。タンパク質ジスルフィドイソメラーゼ (PDI) 酵素は分泌及び細胞膜タンパク質におけるジスルフィド結合の形成を触媒する。ここでは、ヒトPDI又は酵母PDIを調制的に過剰産生する酵母 *Saccharomyces cerevisiae* の組織タンパク質の産生を開示する。これらの株は、治療面で潜在的に重要なジスルフィド結合をもつタンパク質を高量に分泌する。これらの株は、ジスルフィド結合をもつ種々のタンパク質の産生を増加させる可能性を有する。

操作の範囲

1. ジスルフィド結合をもつ組換えタンパク質の製造方法であって、

(a) 組換え遺伝子配内で組換えタンパク質ジスルフィドイソメラーゼを発現させるステップ、及び

(b) 前記組換え遺伝子配内で、ジスルフィド結合をもつ二以上のタンパク質をコードする一つ以上の組換え遺伝子を発現させるステップ

を含むことを特徴とする前記方法。

2. ステップ(a)でタンパク質ジスルフィドイソメラーゼ酵素を産生する組換え遺伝子が、タンパク質ジスルフィドイソメラーゼ酵素をコードする組換え発現カセットのコピーを一つ以上含む請求項1に記載の方法。

3. タンパク質ジスルフィドイソメラーゼをコードする発現カセットが宿主細胞ゲノムに組み込まれる請求項2に記載の方法。

4. タンパク質ジスルフィドイソメラーゼをコードする発現カセットが自律的複製プラスミド上に含まれている請求項2に記載の方法。

11. 酵素が *Saccharomycodes cerevisiae* 又は *Cryptococcus casei* 科の酵母である請求項1に記載の方法。

12. 酵素が *Saccharomycodes cerevisiae* 菌株の株である請求項1に記載の方法。

13. 酵素が *Saccharomycodes cerevisiae* の *C6700* 又は *810* である請求項12に記載の方法。

14. ステップ(b)の組換え遺伝子がアンチセンスである請求項1に記載の方法。

15. ステップ(b)の組換え遺伝子がマダニ菌細胞タンパク質である請求項1に記載の方法。

16. 組換えタンパク質ジスルフィドイソメラーゼが酵母タンパク質ジスルフィドイソメラーゼである請求項1に記載の方法。

17. 組換えタンパク質ジスルフィドイソメラーゼが哺乳動物タンパク質ジスルフィドイソメラーゼである請求項1に記載の方法。

18. 組換えタンパク質ジスルフィドイソメラーゼがヒトタンパク質ジスルフィドイソメラーゼである請求項17に記載の方法。

特表平7-508881 (2)

5. 組換えタンパク質ジスルフィドイソメラーゼが、一つ以上のプラスミド上に含まれている一つ以上の発現カセットでコードされ、ジスルフィド結合をもつ二以上のタンパク質をコードする組換え遺伝子が、一つ以上のプラスミド上に含まれている請求項1に記載の方法。

6. 組換えタンパク質ジスルフィドイソメラーゼが、一つ以上のプラスミド上に含まれている一つ以上の発現カセットでコードされ、ジスルフィド結合をもつ二以上のタンパク質をコードする組換え遺伝子が宿主細胞ゲノムに組み込まれる請求項1に記載の方法。

7. ステップ(b)のジスルフィド結合をもつ二以上のタンパク質をコードする組換え遺伝子が宿主細胞ゲノムに組み込まれる請求項1に記載の方法。

8. タンパク質ジスルフィドイソメラーゼをコードする発現カセット及び組換え遺伝子が同一プラスミド上に含まれている請求項5に記載の方法。

9. ステップ(a)の組換え遺伝子が哺乳動物である請求項1に記載の方法。

10. ステップ(a)の組換え遺伝子が酵母である請求項1に記載の方法。

19. ジスルフィド結合をもつ組換えタンパク質の製造方法であって、

(a) 組換え酵母遺伝子配内で組換えタンパク質ジスルフィドイソメラーゼを産生するステップ、及び

(b) 前記組換え遺伝子配内で、分組ジスルフィド結合をもつ二以上のタンパク質をコードする一つ以上の組換え遺伝子を発現させるステップ

を含むことを特徴とする前記方法。

20. 組換えタンパク質ジスルフィドイソメラーゼが酵母タンパク質ジスルフィドイソメラーゼである請求項19に記載の方法。

21. 組換えタンパク質ジスルフィドイソメラーゼが哺乳動物タンパク質ジスルフィドイソメラーゼである請求項19に記載の方法。

22. 組換えタンパク質ジスルフィドイソメラーゼがヒトタンパク質ジスルフィドイソメラーゼである請求項21に記載の方法。

23. ステップ(a)でタンパク質ジスルフィドイソメラーゼ酵素を産生する組換え酵母遺伝子が、タンパク質ジスルフィドイソメラーゼをコードする組換え発現カセットのコ

ビーを一つ以上含む請求項1に記載の方法。

24. タンパク質ジスルフィドイソメラーゼをコードする発現カセットが細胞系培地中に懸濁される細胞を28℃に配製する方法。

25. タンパク質ジスルフィドイソメラーゼをコードする発現カセットが自律的複製プラスミド上に含まれている請求項23に記載の方法。

26. 組換えタンパク質ジスルフィドイソメラーゼが、一つ以上のプラスミド上に含まれている一つ以上の発現カセットでコードされ、ジスルフィド結合をもつタンパク質をコードする細胞系培地が一つ以上のプラスミド上に含まれている請求項18に記載の方法。

27. タンパク質ジスルフィドイソメラーゼをコードする発現カセット及び細胞系培地が同一プラスミド上に含まれている請求項19に記載の方法。

28. ジスルフィド結合をもつ一つ以上のタンパク質を発現させるために、細胞系培地を30℃以下の温度で増殖する請求項19に記載の方法。

29. ジスルフィド結合をもつ一つ以上のタンパク質を発現させるために、細胞系培地を20℃〜25℃の温度で

増殖する請求項28に記載の方法。

30. ジスルフィド結合をもつタンパク質がアンチスタンである請求項29に記載の方法。

31. ジスルフィド結合をもつタンパク質がマダニ伝染病タンパク質である請求項29に記載の方法。

32. 組換えタンパク質ジスルフィドイソメラーゼを産生する菌種 Saccharomyces cerevisiae の株。

33. 組換えタンパク質ジスルフィドイソメラーゼがヒトタンパク質ジスルフィドイソメラーゼである請求項32に記載の群。

34. 組換えタンパク質ジスルフィドイソメラーゼが酵母タンパク質ジスルフィドイソメラーゼである請求項32に記載の群。

明 細 書

サカモトセシロビシエによるジスルフィド結合をもつ組換えタンパク質の製造を特徴させる方法

発明の要旨

タンパク質ジスルフィドイソメラーゼ (PDI) は、外延タンパク質及び細胞表面タンパク質におけるジスルフィド結合の形成に関する酵素である。芽生動物PDIの保存された (conserved) 「チオレドキシシン」活性部位を抽出するように設計されたオリゴアクリドド (WCHCK) (発明番号: 1) を用いて、本発明者は下等真核生物 Saccharomyces cerevisiae (188) からPDIをコードする遺伝子を単離した。クローニングした遺伝子のヌクレオチド配列及び塩基配列は、分子重さ9.0kDa及びpI 4.1のPDIと一致する。これらのタンパク質を予測させるが、これらは発現後PDIの典型的な酵素である。また、アミノ酸配列は哺乳動物及び鳥類のPDI配列に対して89〜92%の同一性を示す。50〜55%の相似性を示し、全体的構造が極めて類似しており、特に、各々が反転性である二つの160残基セグ

メントが存在する。哺乳動物及び鳥類のPDIに対する最も大きな相同性は、得られた「チオレドキシシン」活性部位を含む領域 (A、B) である。N末端領域は酵素可能な分画シグナル配列の存在を有しており、C末端の4残基のアイノ酸 (HNDEL) (配列番号: 2) は、該タンパク質がSaccharomyces cerevisiae (B. R.) の成分であるということを示している。この遺伝子 (PDI) は、(卵黄) の塊状のコピーを有する胚芽組織には10%のPDI活性レベルを有し、予想された分子量のタンパク質を産生発現する。PDI遺伝子は酵母ゲノム内で非翻訳性であり、定常発現には存在せず、また無誘導でもできない。第1、2、3、4残基をコードする。PDI遺伝子の塩基はハプロロゲニック (haplolethial) であり、これは遺伝子の産物が生育能力 (viability) にとって必須であることを意味する。

チオール: ジスルフィド交換反応を触媒する酵素であるタンパク質ジスルフィドイソメラーゼ (PDI) は、分画細胞のB、R、内腔 (lumen) のような常置タンパク質成分である。試料中の塩析、前処理の位置及び発現型にわたって立証された一連の事実は、酵素が分画タンパ

ク質の生合成である糖の役割を果たすことを示唆しており (Freeman, 1984, Trends Biochem. Sci., 9, pp. 438-441)。これはその場での (in situ) 遺伝的調節機能の研究によって裏付けされている (Kochs & Pieren, 1987, Biochem. J., 246, pp. 4179-422)。PDI を欠失しているミトソーム膜が同時翻訳 (co-translational) タンパク質のジスルフィド形成の特異的役割を示すという発見は (Bullis & Freeman, 1988, Nature, 336, pp. 649-51)、該酵素が分岐及び細胞膜タンパク質の生合成の際に天然ジスルフィド結合形成の触媒として機能すること意味する。この発見は、該酵素の in vitro の触媒作用について知られている事実、即ち該酵素がチオール：ジスルフィド交換反応を触媒して互換のタンパク質ジスルフィドの形成、修復又は異位化を触媒させ、且つ多数にわたる異なる折り畳み方のないタンパク質品質においてタンパク質の折り畳み及び天然のジスルフィド結合の形成を触媒することができるといふ事実と一致している (Freeman et al., 1989, Biochem. Soc. Symp., 65, pp. 167-192)。該酵素の DNA 及び RNA 配列は幾つかの場について知られており (Schereña, B. & Farquhar, Yean, 1989, J. Biol. Chem., 264, pp. 185-198; Farquhar, R., & 1991, Gene, 100, pp. 81-89)、哺乳動物の肝臓から精製して均質にした該酵素の純度のメカニズムに関する情報も与えている (Crook et al., 1989, J. Mol. Biol., 212, pp. 43-52; Freeman & Bullis, 1988, Biochem. Soc. Trans., 16, pp. 99-101; Gilbert, 1989, Biochem. J., 264, pp. 729-739; Lundström & Holmgren, 1990, J. Biol. Chem., 265, pp. 9114-9120; Hawkins & Freeman, 1990, Biochem. J., 275, pp. 385-399)。細胞におけるタンパク質の折り畳み、アッセンブリー及びトランスクレーションの待合物質として現在認識されている多くのタンパク質因子 (Kochman, 1989, Cell, 59, 591-601) のうち、PDI は明確に機能された

酵素である (Schereña, B. & Farquhar, Yean, 1989, J. Biol. Chem., 264, pp. 185-198; Farquhar, R., & 1991, Gene, 100, pp. 81-89)、哺乳動物の肝臓から精製して均質にした該酵素の純度のメカニズムに関する情報も与えている (Crook et al., 1989, J. Mol. Biol., 212, pp. 43-52; Freeman & Bullis, 1988, Biochem. Soc. Trans., 16, pp. 99-101; Gilbert, 1989, Biochem. J., 264, pp. 729-739; Lundström & Holmgren, 1990, J. Biol. Chem., 265, pp. 9114-9120; Hawkins & Freeman, 1990, Biochem. J., 275, pp. 385-399)。細胞におけるタンパク質の折り畳み、アッセンブリー及びトランスクレーションの待合物質として現在認識されている多くのタンパク質因子 (Kochman, 1989, Cell, 59, 591-601) のうち、PDI は明確に機能された

触媒活性を示すという点で重要である。

PDI は哺乳動物の肝臓から容易に精製され、均質酵素は酵素活性を維持する (4, 0-4, 5) を有するホモダイマー (homodimer) (2x57kd) である (Hilson et al., 1984, Methods Enzymol., 107, pp. 281-292)。触媒素はユビクitinase Chismydopomus reinhardtii からも精製された (Kasaka, 1990, Biochem. J., 268, pp. 63-68)。触媒は広範囲の組織で検出されており、予備報告では、PDI 活性は鼠、cerovianus において検出可能であると報告された (Williams et al., 1988, FEBS Lett., 242, pp. 133-135)。最近になって、酵母菌の DNA 配列に見出して由来する多くの PDI の完全アミノ酸配列が報告された。その中には、マウス由来 (Edman et al., 1988, Nature, 335, pp. 267-270)、ウシ由来 (Yamashita, 1987, Biochem. Biophys. Res. Commun., 146, pp. 1485-1492)、ヒト由来 (Philipian et al., 1987, Biochem. Soc. Symp., 65, pp. 167-192)、豚由来 (Schereña, B. & Farquhar, Yean, 1989, J. Biol. Chem., 264, pp. 185-198; Farquhar, R., & 1991, Gene, 100, pp. 81-89)、哺乳動物の肝臓から精製して均質にした該酵素の純度のメカニズムに関する情報も与えている (Crook et al., 1989, J. Mol. Biol., 212, pp. 43-52; Freeman & Bullis, 1988, Biochem. Soc. Trans., 16, pp. 99-101; Gilbert, 1989, Biochem. J., 264, pp. 729-739; Lundström & Holmgren, 1990, J. Biol. Chem., 265, pp. 9114-9120; Hawkins & Freeman, 1990, Biochem. J., 275, pp. 385-399)。細胞におけるタンパク質の折り畳み、アッセンブリー及びトランスクレーションの待合物質として現在認識されている多くのタンパク質因子 (Kochman, 1989, Cell, 59, 591-601) のうち、PDI は明確に機能された

Biochem. Soc. Symp., 65, pp. 167-192)、豚由来 (Schereña, B. & Farquhar, Yean, 1989, J. Biol. Chem., 264, pp. 185-198; Farquhar, R., & 1991, Gene, 100, pp. 81-89)、哺乳動物の肝臓から精製して均質にした該酵素の純度のメカニズムに関する情報も与えている (Crook et al., 1989, J. Mol. Biol., 212, pp. 43-52; Freeman & Bullis, 1988, Biochem. Soc. Trans., 16, pp. 99-101; Gilbert, 1989, Biochem. J., 264, pp. 729-739; Lundström & Holmgren, 1990, J. Biol. Chem., 265, pp. 9114-9120; Hawkins & Freeman, 1990, Biochem. J., 275, pp. 385-399)。細胞におけるタンパク質の折り畳み、アッセンブリー及びトランスクレーションの待合物質として現在認識されている多くのタンパク質因子 (Kochman, 1989, Cell, 59, 591-601) のうち、PDI は明確に機能された

PDI に対応する DNA は容易に同定された変異は、ジスルフィド結合の形成以外の機能の分析を目的とする研究で関

定された。例えば、PDIが、S、R、内の別型 (anisocoon) すなわち新形成 (newly synthesized) プロコラーゲンペプチドの主な翻訳後修飾を触媒する塩基性pH、酵素プロリール-4-ヒドロキシラーゼのβサブユニットとして作用するという事実が立証されている (Fellhaejaanis *et al.*, 1987, 別添引用文献) 101より, 1987, J. Biol. Chem., 262, pp. 6447-49)。また、PDIが細胞内訳のN-グlicosil化のシステムに参与することを示唆する事実もあり (Geetha-Hallib, 1988, Cell, 54, pp. 63-68)、最近では、該酵素が、トリグリセリドを新形成トリタンパク質に交換する複合体に関与しているという説も出ている (Wahlström *et al.*, 1990, J. Biol. Chem., 265, pp. 9800-7)。このように、PDIは分泌タンパク質の両末端及び翻訳後修飾で複数の機能を果たし得る (Freeman, 1989, Cell, 57, pp. 1069-72)。

哺乳動物分泌タンパク質の大部分は、細胞の分子内及び/又は分子間リヌルフィド結合を有している。非恒定的な

体例としては、γ-グルタミル、インターロイキン、免疫グロブリン、プロテアーゼ及びその阻害剤、並びに他の細胞タンパク質が挙げられる。この種のタンパク質は細胞的運搬工学の主要領域の一つであるが、細胞及び細胞内でのこれらのタンパク質の発現における特異的機構では、これらのタンパク質を系統的に恒常性細胞成分として得る上で多くの困難があることが指摘された。その結果、一般的に細胞培養細胞、特定にはタンパク質の折り畳み及びリヌルフィド結合形成をより深く解明する必要があるようになった。

単一の折り畳みドメインを有するリヌルフィド結合をもつタンパク質は通常、正確にリヌルフィド結合した状態を高い収率で形成するため、完全に還元、変性し、次いでin vitroで再定することが可能。このプロセスでは、ゆっくり変性化して天然のリヌルフィド結合を形成する多くの種にリヌルフィド結合した形態の融合蛋白が迅速に形成される。該プロセスは、チオール/スルフィド酸化還元触媒 (例えばGSH及びGSSG) 及びアルカリ性pHによって触媒される。広範囲の機能リヌルフィド形成を防止するためには、タンパク質濃度を低くする必

要がある。通常は、天然タンパク質の生成速度及び高収率な生成収率はどちらも、分子内リヌルフィド結合の増加に伴って低下する。この問題は、各ドメインが折り畳まれてそれぞれの天然リヌルフィド結合を形成して形成しなければならぬ複数のリヌルフィド結合ドメインを含むタンパク質 (例えば細胞プラスミノーゲン活性化因子) ではより重大である。

in vivoのリヌルフィド結合形成プロセスは、細胞と同様に、又は極めて早期の翻訳後修飾として発起する。哺乳動物細胞のS、R、内の別型及び新形成分泌タンパク質の研究では、天然リヌルフィド結合が既に形成されていることが判明している。in vivoのプロセスは、分泌胞内に豊富に存在するタンパク質であり小胞膜の内腔面 (luminal face) に局在する酵素、タンパク質スルフィドイソメラーゼによって触媒されると思われる (Freeman, R. B., 1984, Trends in Biochemical Sciences, 2, 438-443)。この酵素はin vitroで、広範囲のタンパク質濃度においてチオール:タンパク質-スルフィド交換反応を触媒し、天然タンパク質リヌルフィ

ド形成の細胞特異性に必要とされる併存を有する (Freeman, R. B., 1984, Biochem. Soc. Trans., 12, 989-912)。該酵素の組織分布がリヌルフィド結合をもつ分泌タンパク質の生成のそれと合致するという事実 (Frockway, R. B., 1980, Biochem. J., 181, 872-875)、及び(1) 多くの系で、存在する酵素量が、リヌルフィド結合をもつ分泌タンパク質の合成速度の生理学的定数に準じて変化するという事実 (Frockway, R. B., 1980, Biochem. J., 181, 872-876; Freeman, R. B., 1983, "Functions of Glutathione: Biochemical, Physiological & Clinical Aspects", A. Larsson, S. Orrenius, A. Holmgren & B. Mannervik, Raven Press, New York, pp. 271-282; Pover, J. L., 1989, FEBS Letters, 242, pp. 357-

382) が挙げられる。

酵母の発酵は、多くの動物系 (Lambert, H. 及び Freedman, R. B., 1983, Biochem. J., 213, pp. 229-234) 及びコルバ [de Azevedo, O. M. V. 等, 1983, Biochem. Soc. Trans., 12, 1043] で精製されており、分子生物学及び動力学的特性の研究が容易に観察された [Freedman, R. B. 等, 1984, Biochem. Soc. Trans., 12, pp. 938-942; Brockway, B. 等, 及び Freedman, R. B., 1984, Biochem. J., 219, 57-59]。しかしながら、酵母は、下等真核生物又は細菌にないではまだ十分に研究されていない。少なくとも一部の酵母分泌タンパク質 (例えばセラーゼ) はワスルフィド結合を含んでいるため、酵母と高等真核生物との間の、分画に関するメカニズム及び分子成分の異同の相違は、酵母又は酵母細胞が酵母内に存在することを容易に検出させる。

商業的に重要な糖乳製タンパク質の発酵のための芽胞型 (*versatile host*) としての酵母の選

用は、酵母分泌の限定された能力、及び該能力を高等真核生物のそれとの相違 (特に糖グリコシル化における相違) によって、ある程度の高さを強いられる。

本発明は、酵母タンパク質ワスルフィドインメラゼを産生する酵母又は微生物細胞内でワスルフィド結合タンパク質を産生するための新規の方法と、タンパク質ワスルフィドインメラゼを産生する酵母又は微生物細胞とを提供する。本発明は、ワスルフィド結合をもつ糖鎖又は分泌タンパク質の分画を実質的に且つ予望的に増進させる酵母と酵母宿主細胞とを提供する。

発明の要旨

ヒト及び酵母タンパク質ワスルフィドインメラゼ (PDI) をコードする DNA を断片し、プロモーターと転写ターミレーターとを含む担体セグメント又はベクターにクローニングする。PDI をコードする DNA を含む担体セグメント又はベクターを酵母細胞内にトランスファースると、該細胞は PDI タンパク質を効率的に産生する。これらの PDI 産物産生細胞を、ワスルフィド結合をもつタンパク質の分離のための糖鎖発出として使用する。ワスルフィド結合をもつタンパク質の分離は、PDI 産物産生細胞から、

遠隔レベルの PDI を産生する酵母細胞と比べて実質的に増加する。

図面の簡単な説明

第1図は、ワスルフィドプラスミド上に酵母 PDI をコードする遺伝子を有する 5.62 kb の複製型酵母の無細胞抽出液の SDS-PAGE 分析を示している。

第2図は、「COMPARE」及び「DOT-BLOT」ソフトウェア (UW-CGC) を用いた糖鎖 PDI とラット PDI との間のドットブロットアラインメント (dot alignment) を示している。哺乳動物 PDI のドメイン構造は同じ糖鎖で糖鎖アラインメントの下に示されている。

第3図は、酵母 PDI 産物の糖鎖に関するストラテジー及び糖鎖を示している。パネル (b) は、0.111:1.115 範囲に對して異型糖結合の H₁₉ AS 224 基の四分子 (tetraol) 分析の結果を示す。

第4図はワスルフィド PDI の糖鎖を示している。

第5図はワスルフィド PDI-3P-H-PDI の糖鎖を示している。

第6図は、pUC18-GAL10p-K) ADHI1

として知られているプラスミド p401 の構造を示している。

第7図はワスルフィド PDI (8-GAL10p-Y PDI-ADHI1) の構造を示している。

第8図は、K901として知られているワスルフィド KH42/ATTS の構造を示している。

第9図は YS24-GAL10p-Y PDI の構造を示している。

第10図は YS24-GAL1p-MF-a-h PDI の構造を示している。

第11図は pUC-GAL1/10-h PDI/ATTS の構造を示している。

第12図は pUC-GAL1/10-Y PDI/ATTS の構造を示している。

発明の詳細な説明

酵母におけるタンパク質の折り畳み及び分泌のプロセスは極めて複雑であり、酵母子研究に基づいて言えば、30以上の遺伝子産物が関与している [Forsberg et al., A. 等, 1981, Methods Enzymol., 94, pp. 652-674]。これらの産物とし

では、ペプチルプロサルシーストランスイソメラーゼ、
PDI及び他のチオレドキシリン様タンパク質、BiP、催
マの分子シャペロン(molecular chaper
one) (Kasper D., Haasら 他)、シグナルペプ
ターゼ、シグナル認識タンパク質、E、R、への膜移行の
トランスローションに関与する種々のタンパク質、ER
の強オの清液及び強液成分、グルコ(Gluc)、並び
にまだ特徴が解明されていない部分糖鎖及び多くのタン
パク質が挙げられる(Transacil, A., 5, 199
1, 細胞引用文献: Rothman, J. E. 及び Orc
il, 1992, Nature, 355, pp. 40
9-415; Gething, M. G. 及び Sambro
ok, G., 1992, Nature, 355, pp. 8
3-45)。このような細胞中に存在する、単一の成分(特
にPDI)の量が低下するだけで特定の異質タンパク質の
分泌が実質的に増加するという可能性は、当業者には強
て認識しにくいことと思われる。そこで本発明は、PDI
の量が増加しただけで、例えばアンチストキシンのような分
泌タンパク質の量が有意に及び実質的に増加するという強
めて意外な結果を達成した。これは、タンパク質の折り畳

み及び/又はジスルフィド結合形成の促進に関連している
と推測される可能性がある。

本発明は、タンパク質ジスルフィドイソメラーゼ(PDI)
をコードするDNAを過剰発現させることにより、認
知主細胞による組織タンパク質の産生を増加させる
方法を提供する。本明細書中のPDIとは、分子内及び分子
間ジスルフィド結合の形成を特異的に促進する酵素を意味
する。

幾つかの種に由来するPDI遺伝子のDNA配列は当業
界で知られている。これらの種の非限定的具体例としては、
ヒト、ウシ、ラット、ニワトリ及び酵母が挙げられる。
[Miyunaga, 1990, J. Biochem.,
108, pp. 846-851; Schenone, 1
991, Yeast, 7, pp. 185-193]。

PDIをコードするDNAの組織における過剰発現は胚
芽の細胞の細胞又は組織であってよく、非限定的具体例と
しては、哺乳動物及び他の脊椎動物の細胞及び組織、並び
に下等無脊椎動物の細胞及び組織が挙げられる。ここでは本
発明者、組織発現細胞組織内で発現される酵素及びヒト
PDIを用いて説明する。当業者には容易に理解されるよ

うに、本発明では別の組織器官、例えば非限定的具体例と
して哺乳動物細胞、葉肉細胞、癌腫のような原核生物の細
胞、造血細胞、並びに酵母及び糸状菌類のような下等真核
生物の細胞も適用し得る。また、これも当業者には明らか
なように、肝臓及びヒト細胞以外の細胞に由来するPDI
コーディングDNAの使用も本発明の範囲内に包含される。
PDIコーディングDNAの別の組織の非限定的具体例とし
ては、ヒト以外の脊椎動物、例えばラット及びマウス、
非脊椎動物、例えば昆虫、並びに下等無脊椎動物、例えば海
綿が挙げられる。

Rothblatt及びMeyerの方法(1988,
Cell, 54, pp. 613-628)の方法で、Cre
reativityから調製したミクロソーム膜フラク
ションレベルのタンパク質ジスルフィドイソメラーゼ(PDI)
活性を有していたが、細胞レベルの蓄積量によって
8〜20倍増加した。これは、哺乳動物の同じ細胞コンパ
ーメントに存在するPDI (Mills, 1983,
Biochem. J., 218, pp. 245-8); L
amber及びFreeman, 1985, Biochem.
J., 228, pp. 635-45)及びユスチ

の同じ細胞コンパートメントに存在するPDI (Rod
n, 1982, PDBS Lett., 138, pp.
121-4)と類似の酵素が、低濃度の小腸液の内部に存
在することを示唆するものであった。高等真核生物酵素に
対して相同の、PDIをコードする遺伝子をクローニング
した。高度の効率を示す可能性が最も高い候補は、腎臓動
脈PDIにおいて顕著に発現されており、特に二つの機能
能ジスルフィド結合形成の領域でチオレドキシリンに對して強
く強い親和性を示すa及びa'ドメインであると推定される。
高濃度の共通配列はPVLGWCHGK (配列番号:
4)である(Parkman, 1988, 未出刊
文献)。発現発がんマウスマウスマウスマウスマウスマウス
ンパク質(bias)に基づいて設計した(Shapira,
1986, Nucleic Acids Res., 14,
pp. 5125-43)。これを同様に調製して、マルチ
ビ-YEプラスミドpMA3内で複製した酵母ゲノ
ライブラリーのスクリーニングに使用した(Crouse
及びDutille, 1987, Mol. Gen. Gene
s., 210, pp. 581-2)。スクリーニング二つ
の強くて特異的なクローニング(C7及びC10と称する)が同

取され、予備製図範囲を作成した結果、両入部サイズはそれぞれ4と及び14、5とであり、二つの挿入部は共通の制約部位をいくつか有することが判明した。フロー・C7の導入物を更に分解した。

クロームC7が滅かにFD1と同一であることを確認する
ために、解題、carewifisを解読40/4
C [a t r r] u r e 2 h i s 3 i e u 2 i u
1986年、E.M.B. の J. i. x p.
605-608) をクローム7及びプラスM p h A 3
aで複製した。S.D. - P.A.G. 2分析の結果、C7の
組成は、正座58kDaのポリペプチドを産生し、
これは約72kDaの第二のポリペプチドと関係
することが判明した(第1図)。また、二つの異なる組
成成分をFD1と産生してアセチルした(38、6×10⁴
U/ml 25kDa)を有した。これら二つの成分は、活
性部位異相WCPCCK(異相番号:8)を有する5、6
prewifisはチロシドキナーゼは分子重量的に2kDa
であるため(Parque, 1970、J. B. y i,
Chem., 245, no. 2366-2371、1970、
C7は

11-5-9 R フラグメントの配列決定を両方の酸で行った。

DNA 配列は、予測された分子重さ 5,032 の、53
Q 17 (数をもつ) リベラチドをコードすることができる
1593 bp の一置換型の特異性を予測させた (Far
quhar, R., 中, 新出刊文庫, 第 2 版)。該
続体は、通常に多い N 置換をコードする酵素
DNA に典型的なコドンバイアスを有していた (Benne
sen 及び Hall, 1982, J. Biol. Che
m., 257, p. 3028-3031)。コドンバイ
アス指数 (codon bias index) の計算値
は、0.4 であった。

決定されたメクロオキシド配列の分布は、多数の標準的酸塩基プロモーター及びターミネーターモチーフを明らかにした（Figueroa et al., 1994）。前述引用文献、第2巻参照）。これらのモチーフは、総取り時に好んで-1及び-1.28との間に位置する（TA）_n配列の一部としての間欠的ポリミジに富んだ領域（7.メクロオキシドのうちの3/4）と重合し、総取り時の3'末端には、TA_n

ーンがPDIをコードし、チオレドキシンをコードしない
という習性を裏付けるものであった。

決定上の PDI コーディング規則の位置を決定する「i o c a i」と「s」のために、C プログラムを専用の制御型で用いて、制作者をユニコード・システムにトランスフォームし、即座にその PDI を「高度な状態」でグラフィカルオナードでプロットした。この操作では、8 ビットの s a m e ミニ s a i フラグメントと、それぞれ 5 の並び、5 通りの二つの明らかな異なるものを i n d e x フラグメントとが同定された。特定のパターンは、底層部立のロニーセとして含む PDI について予想されるであろうように、「高度な状態」プログラムの模倣が二つ存在するとことを示唆するものであった。二つの i n d e x 位置から予備 PDI に分析分けた、異なる数個の PDI に対して許容可能な結果を示す符号（O R F）の評価が明らかにされたが、これは正確な配列ではないため、他に i n d e x 1 が提供されているに違いないことも判明した。この規則は、詳細な無制限図の作成と DRI に応答的によりによって確証された。両者の制御型とよりグラフィカルオナードタイマーを用いて、二つの標準化 PDI 1 と PDI 2 を含む、8 ビットの PDI

新アーク・ネクターに就いて、S. C. Greville 及びその転写特化及び又はポリアデニル化のメカニズムと関連される配列 (Zaret 及び Sherman, 1982 Cell, 28, pp. 568-73)、並びに真核生物ポリアデニル化部位 (Proudfoot 及び Brownlee, 1982 N. Nature, 294, pp. 211-4) の配列に与える相関が提示する。

核クローム化塩無が配座されたかどうかを調べるために、核内体に対して内側の 800 bp の HindIII - SauI フラグメントを用いて、二つの異なる装置間、グルコース及びアサテートで、異なる増殖した細胞株間で増殖させた SalI - SalI の二つの異なる株 (MD40/4C 及び SKQ29 (a/a accl / + accl2 / + his1 / +; Gattion, 1979, J. Biol. Chem., 254, p. 5865-5869)) から抽出した全 RNA 試料のノーザンブロットをブローブした。菌糸増殖細胞では、グルコース及びアサテート増殖間で同一 1.8 kb 転写産物が検出されたが、発酵増殖では転写産物は検出できなかった。核内体のサイズは、MD40/4C 及び SKQ29 菌株間の相対的に異な

約200ヌクレオチドを考慮に入れて、読取り枠により予測された通りであった。

予測されたアミノ酸配列は、下記の理由によって誤配列が正にPDIであることを強く示唆した：

(i) 予測された59kDaの分子量と、哺乳動物PDIに典型的なPI(4,1)とを有していた；

(ii) 該アミノ酸配列は、B597Fドメインでソフトウエア(GWGC, Univerality of Wiscosity)によって決定されたように、先に報告された哺乳動物及び鳥類のPDI配列に対して、30-52%の全体的同一性と、58-66%の全体的類似性を示した；

(iii) 該アミノ酸配列中の重畳58-65及び403-410に「サロドキシレン」活性部位の二つのコピを有していた。また、これらの配列は、哺乳動物PDI内の重畳α'領域に対して高度のアミノ酸同一性を示すPI07A1ノ数のより大きい内部重複(insertion) duplication)の一部であった(第2図)。

酵母及び哺乳動物PDI配列を並べるとα1segment)、α及びα'領域の外部に、大きな重複を示す別の領域が存在することも明らかにになった(第2図)。

U. F. 6, 19814, Nucleic Acids Res., 12, pp. 1049-1068)を有する1.8kbのBglIIフラグメントがPDI1コーディング配列内の5.6kR V活性位に挿入されている(第3図)ヌル(null)対立遺伝子を構築した。

h1132二重体第2, 6.6kR deaminated V11324株(A533241: {Spk} ding, A., 1988, Ph. D. Thesis, University of Kent))を、p11111: H11324重複を有するDNAフラグメントで形質転換して、PDI1遺伝子の二つの染色体コピーのうちの一つを細胞非複製対立遺伝子で置換した。互いのH113245324形質転換体(Y1, Y2及びY3)を更に調べた。

いずれの場合も、二重体の遺伝子形成は両分子当たり二つの遺伝子可能配列を生成した(第3図)であり、これは単純でh11324であった。この結果は、変形型配列g11111: H11324染色体に誘起していたことを示すものである。

正確な遺伝子置換がH11324形質転換体Y1及びY2において生じたことは、800bpのH1132411111: S11111フラグメントをプローブとして用いる、P11111で消化したプロットされた転写ゲノムDNAへのサザン

ハイブリダイゼーションにより確認された。PDI1遺伝子は内部P11111部位を含まない(第3図)、H11324遺伝子はP11111部位を含むため(第3図)、これで2つの遺伝子可能配列が抽出されたが、Y1及びY2形質転換体では9kb及び2.2kbという二つのバンドが、由来の異なる二つのバンドからなるかと推定される9kbバンドと共に抽出された。これらのデータは、二つの染色体のうち一方の染色体上のPDI11111遺伝子がH11324対立遺伝子で置換され、このような事象がハプロ型致死性であることを立証するものである。

酵母PDI1をコードするDNAを分子的にクローニングするためには、種々の方法のうち低コストのものを使用し得る。これらの方法の非典型的な例としては、適当な発現ベクター系内でのPDI1含有DNAライブラリーの構築に次ぐ、PDI1遺伝子の直接的発現検出が挙げられる。別の方法は、

また、コードされたポリペプチドの別の二つの特徴は、これがS. cerevisiae小胞体の成分であることを示している。該タンパク質は、細胞上の分泌シグナルの特徴を有する著しく疎水性のN-末端配列をコードし

(Giersch, 1989, Biochemisty, 28, pp. 923-930)。西村のC末端アミノ酸は酵母PDIのそれと同じであり(Normington, 1989, Cell, 57, pp. 1223-1236)。S. cerevisiaeの小胞体保持シグナルであると報告されている(Pelham, 1988, EMBO J., 7, pp. 1757-1762)。

本発明者は、クローニングS. cerevisiae PDI1遺伝子をPDI1と命名した。このS. cerevisiae PDI1遺伝子はゲノム内のたゞ一つのコピーに存在する。これは、前述のQ. skd M11111-S11111フラグメントを標的のゲノム構造化に用いるプローブとして用いる高電圧ハイブリダイゼーションにより確認された。

単一のPDI1遺伝子が生存能力にとって必須であるかどうかを調べるためには、H11324遺伝子(Montell,

ハイブリダイゼーションにより確認された。PDI1遺伝子は内部P11111部位を含まない(第3図)、H11324遺伝子はP11111部位を含むため(第3図)、これで2つの遺伝子可能配列が抽出されたが、Y1及びY2形質転換体では9kb及び2.2kbという二つのバンドが、由来の異なる二つのバンドからなるかと推定される9kbバンドと共に抽出された。これらのデータは、

二つの染色体のうち一方の染色体上のPDI11111遺伝子がH11324対立遺伝子で置換され、このような事象がハプロ型致死性であることを立証するものである。

酵母PDI1をコードするDNAを分子的にクローニングするためには、種々の方法のうち低コストのものを使用し得る。これらの方法の非典型的な例としては、適当な発現ベクター系内でのPDI1含有DNAライブラリーの構築に次ぐ、PDI1遺伝子の直接的発現検出が挙げられる。別の方法

は、バクテリオファージ又はプラスミッドベクター内で構築したPDI1含有DNAライブラリーを、PDI1タンパク質のアミノ酸配列から設計した抗体材料を用いて

ハイブリダイゼーションにより確認された。PDI1遺伝子は内部P11111部位を含まない(第3図)、H11324遺伝子はP11111部位を含むため(第3図)、これで2つの遺伝子可能配列が抽出されたが、Y1及びY2形質転換体では9kb及び2.2kbという二つのバンドが、由来の異なる二つのバンドからなるかと推定される9kbバンドと共に抽出された。これらのデータは、二つの染色体のうち一方の染色体上のPDI11111遺伝子がH11324対立遺伝子で置換され、このような事象がハプロ型致死性であることを立証するものである。

酵母PDI1をコードするDNAを分子的にクローニングするためには、種々の方法のうち低コストのものを使用し得る。これらの方法の非典型的な例としては、適当な発現ベクター系内でのPDI1含有DNAライブラリーの構築に次ぐ、PDI1遺伝子の直接的発現検出が挙げられる。別の方法

ゲノムライブラリーでスクリーニングすることからなる。例えば、この方法は、プラスミドファントムベクター内で複製したヒト又は他の哺乳動物のゲノムライブラリーを、既知塩基配列の探知のアミノ酸配列をコードする塩基DNAプロローブでスクリーニングすることからなる。

組織内には容易に選別されるように、別のタイプのライブラリー、及び別の組織又は組織タイプから得られたライブラリーもPDIをコードするDNAの組織に有用であり得る。別のタイプのライブラリーの非特定の具体例としては、胎盤組織以外の胎のヒト、脊椎動物及び下等脊椎動物組織又は細胞系に由来するcDNA及びゲノムDNAライブラリーが挙げられる。

当業者には明らかのように、適当なライブラリーは、PDIは存在する細胞又は細胞系から選別し得る。PDIをcDNAを単離するためのcDNAライブラリーの形成で使用するための細胞又は細胞系の選択は、前述の方法を用いて、最初に組織結合PDI抗体を測定することにより決定し得る。

cDNAライブラリーの形成は当業者にはよく知られている標準的方法で実施できる。よく知られているcDNAライ

ブラリーを形成し、その中に存在する分子のスクリーニングにより組織的に特異性、組織発現又は高度生物活性細胞内にトランスフェルし得る。この種の操作を行うための技術は、既述のManiatis, T. の文献に詳述されており、当業者にはよく知られている。

本明細書では、複製ベクターは、遺伝子のクローニングの経路と、cDNAの適当な型番内での複製とに必要なDNA配列であると定義される。この種のベクターは、細菌、真菌、植物細胞、動物、両生類及び動物細胞の様々な型番の型番内で再組換え能力を発現させるのに使用し得る。

特異的に設計したベクターは、誘導剤、例えば細菌誘導剤又は細菌-動物細胞間のDNAのシャッリングを可能にする。通常は複製した複製ベクターは、宿主細胞内の自複製のための複製起点と、選択可能なマーカーと、同定数の有能な複製原基部位と、高コピー数の複製シグナルと、適切なプロモーターを含んでいなければならない。プロモーターは、RNAポリメラーゼをDNAに結合させるRNA塩基を同定させるDNA配列であると定義される。無能力プロモーターは、mRNAが高頻度でトランスクリプトされる

イプサイ-複製方法は、例えばManiatis, T., Fritsch, E. F., Sambrook, J., Molecular Cloning: A Laboratory Manual (Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, New York, 1982)に記載されている。

PDIをコードするDNAを適当なゲノムDNAライブラリーから選別し得ることも当業者には知られており得る。

ゲノムDNAライブラリーの形成は当業者にはよく知られている標準的方法で実施できる。よく知られているゲノムDNAライブラリー形成方法は、Maniatis, T., Fritsch, E. F., Sambrook, J., Molecular Cloning: A Laboratory Manual (Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, New York, 1982)に記載されている。

前述の方法で得たクローンPDIは、組織発現PDIを産生するために、適当なプロモーターと別の遺伝子転写調

ようにするプロモーターである。複製ベクターの非同定性的発現型としては、クローニングベクター、複製されたクローニングベクター、複製型に設計されたプラスミド又はウイルスが挙げられる。

哺乳動物細胞内で組織発現PDIを誘発させるためには、種々の哺乳動物複製ベクターを使用し得る。組織発現PDI発現に適合する型番の哺乳動物複製ベクターの非同定性的発現型としては、pMCTneo (Stratagene), pXT1 (Stratagene), pSOS (Stratagene), pBOPSV2-neo (ATCC 37593), pBPV-1 (S-2) (ATCC 37110), pBPV-MMneo (342-12) (ATCC 37224), pRSVcat (ATCC 37199), pRSVneo (ATCC 37198), pSV2-dhfr (ATCC 37146), pUC28 (ATCC 37460) 及びpZD25 (ATCC 37555) が挙げられる。

PDIをコードするDNAはまた、種々の哺乳動物細胞内での組織のために複製ベクターにクローニングし得る。哺乳動物細胞は複製動物、例えば非限定動物系株として

は、35℃での増殖が抑制を招き、その結果、アルファ産生因子プロモーターが不活性化である状態にαの転写が生じる。温度を35℃にシフトすると、細胞は変態的にαに戻り、その結果プロモーターが活性化になる。もし α→β 阻害を有する際の役割は、後つかの出来事（リベグナドの制御された発現）について説明されてきた。

当所者は容易に溶解されるように、P.D.I.の発達のた
めの適当な懸濁液に反応物の候補の中から選ばれる。選
定は懸濁液の非限定性基準例としては、プロテアーゼ失
活及び強化したグリコシル化能力といったような遺伝子型の
及び表現型特徴を有するものが挙げられる。

Saccharomyces属に類々種がある。 S. cerevisiae は酵母の外ポリペプチドの産生と DNA 再結合のための宿主として最も一般的に従来である。しかしながら、S. cerevisiae は、S. cerevisiae の他の種の間の区別は必ずしも判別できない。これらの種の多くは S. cerevisiae と交雑することができ、S. cerevisiae によるプロモーターと複製の因子は同じプロモーターを有していると思われる。従って、発酵剤には通常に選ばれるように、PD1 開発のための酵母

述べて、出来る場合には簡単に理解されるように、FDI 発生
 のための創生の選択地図は、Saccharomyces
uvarum 科及び Aspergillus 科の特別
 の酵母菌の種、例えば非常に典型的例として Candida
 sp., Hansenula sp., Kluyveromyces,
Pichia sp., Saccharomyces cerevisiae 及び
Trichosporon にまで広がる。

良因ベクターは、多くの方法、特に標準化された菌株群として大腸菌株、トランスアクリンション、プロトプラスチ融着法及び電穿孔法等のうちの任意の方法を用いて製剤化細胞に導入し得る。免疫ベクター含有細胞は接種後ケラチンに感染し、強々に発症して、F₁D₁タンパク質を産生するかどうかを調べる。F₁D₁免疫原性細胞ケラチンの同定は、幾つかの方法、例えば免疫反応性菌株群としてF₁D₁菌株体に対する免疫反応の形成性、及び免疫反応細胞F₁D₁元株の存在によって容易に及ぶ。

PD1 DNAの発現はまた、*in vitro*で産生した合成のRNAを用いて実施し得る。合成のRNAは種々の細胞転写システム、例えば細菌転写系例としてコルギ転写系例及び動物細胞転写系例の中で発現的に観察できる。

の過酸化物は、Saccharomyces 属の別名で、
例えば赤腐敗の具体例として carlsbergensis、diastolicus、elipiglaporus、kruyveri、montanus、norbensis、oviformis、rouxi 及び uvarum にまで広がる。

発つきの肺炎菌、または Candida、Histoplasma、Pneumocystis carinii、Legionella pneumophila 及び Cryptosporidium 等、唯一の増殖用炭基源としてのメタノールの利用について炭基の代謝経路を有することが判明した。この代謝経路に關する研究ではアルコールオキシゲナーゼの遺伝子は Pleiotropic oxidoreductase により同定されている。Pleiotropic oxidoreductase はアルコールオキシゲナーゼプロモーターは同定されて、炭基のメタノール炭基に転写であることが判明した。このような炭基可能プロモーターは、炭基内でのポリペプチドの発現に有用である。特に、このプロモーターは、Pleiotropic oxidoreductase 内での異種遺伝子の誘発可能な炭基用のプラド上で発現であることが判明した。この炭基は、動物の肺母癌に類似型の炭基ペプチドの誘発と DNA 内挿作用のための宿主として炭基する可能性を強調するものである。

と共に、建群ベースのシステム、例えば非定常的異相列としてカエル卵母細胞内へのマイクロインジェクションで胎卵母細胞に誘致される。

消費者には容易に理解されるように、P・D・Iは、組換えたり抑一のコピー又は複製のコピーで、遺伝情報ゲノムに組み込まれた複製及び複製セットに発生する組換え型として再発見され得る。また、これも普通法には用いるかであろうが、P・D・Iは、組換えたり抑一のコピー又は複製のコピーで、標準的複製システム上で存在する遺伝的複製複製セットに対する組換え型として発見され得る。

組織化 FDI を実現する組織化垂直統合は、別の組織化垂直統合の発展のための基盤として役立て得る。本発明の新規な方法は、組織化 FDI を促進する意思疎通手段で、スバル FDI 結合をもつ組織化タンパク質コード番号と、スバル FDI 結合をもつタンパク質コード番号との間接的な結合をさせることにより、スバル FDI 結合をもつ組織化タンパク質の効果を実質的に増進させる。前記数値は容易に理解されるように、本発明の方法ではスバル FDI 結合をもつ複数のタンパク質が産出される。スバル FDI 結合をもつタンパク質の非産出の例は列挙しては、分析されるべきは細胞結合結合を担持するタンパク質である。

ジスルフィド結合をもつ単量タンパク質の発現のための
 遺伝子DNA構築物は、PDIについて詳述した方法によっ
 て形成される。通常者には知らぬように、ジスルフィド
 結合をもつ超換タンパク質をコードするDNAは、細胞
 当たり一コピー又は複数のコピーで、宿主細胞ゲノム
 に組み込まれた超換カセットから発現される。また、
 これら通常者には知らぬであろうが、ジスルフィド結合を
 もつ超換タンパク質をコードするDNAは、細胞当たり
 一コピー又は複数のコピーで、固相担持プラスミド
 上に存在する超換カセットから発現される。更に、
 これら通常者には容易に理解されることであるが、PDI
 をコードするDNA及びジスルフィド結合をもつ超換タン
 パク質をコードするDNAは、細胞当たり一コピー
 又は複数のコピーで、同一プラスミド上に存在し得る。ジ
 スルフィド結合をもつ二つ以上のタンパク質が、組み込ま
 れたカセットもしくはプラスミド上のカセット、又はこれら
 の組合せから同時発現されることも通常者には知らぬ
 であろう。

超換系宿主細胞内でのPDIの発現後は、PDIタン
 パク質を回収して、タンパク質中のジスルフィド結合の形成

を制御することができる近世型の精製PDIを回収し得る。
 PDIの精製方法は幾つか存在し、説明に属している。突然
 死症に由来するPDIの精製について述べたように、超
 換PDIは細胞溶解液及び抽出物、又はならし培養液等
 から、塩分、イオン交換クロマトグラフィー、サイズ排
 除クロマトグラフィー、ヒドロキシルアパイト吸着クロ
 マトグラフィー及び様々な相互作用クロマトグラフィーを
 逐々に組合せて又は単独に用いて精製し得る。
 更に、超換PDIは、PDIに特異的なモノクローナ
 ル又はポリクローナル抗体を用いて形成したイムノアフィ
 ニティカラムを用いて、別の細胞タンパク質から分離する
 ことができる。

PDIに対する単一特異性抗体は、PDIに対して反応
 性を示す抗体を含む細胞溶解液等から精製するか、又は
 Rohrer及びMiles Inc. Name No. 25
5: 405-497 (1975) に記載の方法を用いて、
 PDIに対して反応性を示すモノクローナル抗体として製
 造する。本明細書中の単一特異性抗体は、PDIに対する
 均一結合特性を有するモノクローナル又は多クローナル抗体
 であると認識される。本明細書中の均一結合 (homogeneous

oligoclonal) という用語は、抗体が特定の
 抗原又はエピトープ、例え前述のようなPDIと結合す
 る能力を有する。該免疫学的抗体は、マウス、ラット、モル
 ムット、ウナギ、ヤギ、ウサギ等の動物、好ましくはウサギ
 を、免疫アジュバントを用いて又は用いないで、通常な調
 理のPDIで免疫感作することにより産生する。

最初の免疫感作の際には抗原血清を組換する。好ましく得
 る免疫アジュバントと組合せれたPDIを約0.1mg〜
 100mgで動物内に投与する。好ましく得る免疫アジュ
 バントの非特異的免疫原としては、フロインドの完全アジュ
 バント、フロインドの不完全アジュバント、ミウバン抗
 体物、Crotonoscholesterol adjuvant described 及び
 RIAを含む油中水エマルジョンが挙げられる。最初の
 免疫感作は、好ましくはフロインドの完全アジュバント
 中の酵素を、皮下 (s.c.)、腹腔内 (i.p.) 又はその両方
 で複数の部位に注射することからなる。各動物から一定の
 時間経隔、好ましくは一週間経隔で採血して、抗体力価を
 測定する。動物には、最初の免疫感作後には、ブースター
 剤をしてもなくてもよい。ブースター注射をした動物に
 は、通常、同量のフロインド完全アジュバントで酵素を同

一経路で与える。ブースター注射は、幾つか回が与えられる
 までの定期的期間で得よう。各ブースター注射は約7日
 後、又は第一免疫感作の後で約1週間後に動物から採血し、
 血清を回収し、アリコートを約20℃で貯蔵する。
 通常系マウス、好ましくはBalb/cをPDIで免疫
 感作して、PDIと反応するモノクローナル抗体 (mAb)
 を製造する。マウスは、前述のように、PDI又はSC経路
 で、同量の許容し得るアジュバントに投入した約0.5m
 lの懸濁液又は抗原液を注射し、1mg〜約10mg、
 好ましくは約1mgのPDIで免疫感作する。好ましくは
 フロインドの完全アジュバントを使用する。マウスは0日
 後に最初の免疫感作を受け、約8〜約9週間後において
 採血する。免疫感作したマウスには、血清採血後血清
 液水のような緩衝液を約0.1〜約10mgのPDI
 の量からなる一層以上のブースター免疫感作を、単独
 剤 (i.v.) によって与える。該免疫性マウスに由来するリン
 パ球、好ましくは脾臓リンパ球を、通常に全血の標準的
 方法で免疫マウスから脾臓を分離することによって得る。
 脾臓リンパ球と通常な融合相手、好ましくは骨髓腫細胞と
 を、特定のハイブリドマを形成させる条件下で融合して、

ハイブリドーマ細胞を製造する。融合相手の非限定例を併列としては、マウス腎臓腫瘍P3/N33/A4-1; MFC-11; 9-194及び92/9が挙げられるが、好ましいのは92/9である。抗原産生細胞及び骨髄腫細胞を、約30%〜約50%の濃度で、約1000mOsmのポリエチレングリコール中で融合させる。融合容に公知の方法で、ヒポネキサンチン、チロシン及びアミノプテリンを添加したグルベック改良イーグル培地(DMEM)での増殖により、融合したハイブリドーマ細胞を選択する。約14、18及び21日目には増殖阻害剤から上清液を回収し、PDIを抗原として用いる固相イムノラジオアッセイ(SPIRA)のようなイムノアッセイによってスクリーニングし、抗体の産出を調べる。mAbのアイソタイプを調べるために、塩漬液をOuchterlony沈降アッセイでも検査する。抗体産生ウエルからのハイブリドーマ細胞を、MacPhersonの改良アガール技術(Goat Agar Technique, Tissue Culture Methods and Applications, Kruse及びPeterson編, Academic Press, 1973)によりコロニー

化する。

細胞選別例(priming)からの4日後、ブリスタン抗体9e1b/セマウスに、マウス当たり約0.5mIで、約2×10⁶〜約5×10⁶のハイブリドーマ細胞を注射することにより、モノクローナル抗体をin vitroで産出する。細胞のトランスフォーマーから約3〜12日後に上清を回収し、当業者に公知の方法でモノクローナル抗体を精製する。

約2%のウエル当量を生じるDMEM中でハイブリドーマを増殖させてin vitroのmAbを生じを行い、十分は量の特異的mAbを得る。抗原Abを当業者に公知の方法で精製する。

抗体又はハイブリドーマ培養液の試料液を、種々の血清学的又は免疫学的アッセイ、例えば非限定例を併列として、沈降法、交差反応、ELISA(easy-me-link)及びラジオイムノアッセイ(RIA)で測定する。選択的アッセイを用いて、抗体又は細胞及び細胞抽出物のPDIの存在を検出する。

当業者には容易に理解されるように、単一特異性抗体を

製造するための前述の方法は、PDIポリペプチドフラグメント又は完全体のPDIポリペプチドに特異的な抗体の製造に適用し得る。

抗体がアガロースゲルビーズ支持体との共有結合を形成するようにN-ヒドロキシステインビドエステルで予備活性化したゲル支持体であるAffigel-10(Biorad)に抗体を吸着して、PDI抗体アフィニティカラムを形成する。状態は、スベーパーラムとのアミド結合を介してゲルに結合する。次いで、残りの活性化エステル1M ユグノールアミンHCl(pH8)で中和する。カラムを水洗び0.23M グリシンHCl(pH2.5)で順次洗淨して、未結合抗体又は未洗淨タンパク質を除去する。次いでカラムをリン酸緩衝生理食塩水(pH7.2)中で平衡化し、PDIを含む細胞抽出液又は細胞抽出物をゆっくりとカラムに滴す。該カラムをリン酸緩衝生理食塩水で先手洗淨(Ass)がバクテララウンドに低下するまで洗淨し、次いでタンパク質を0.23M グリシンHCl(pH2.5)で洗淨する。次いで、特異PDIタンパク質をリン酸緩衝生理食塩水に対して洗淨する。

以下の実施例は本発明を説明するためのものであって、その範囲を限定するものではない。

実施例 1

抗体の増殖と検出

Selection of secreting cells
MD40/4C(MATa, level 2-3-112, vfr 2, hie 3-11, -118, frc 1)及びA53824(MATa/MATa⁺ hie 8/hie 3, level 2, vfr 3/vfr 3, frc 1/frc 1)を、96PD(1%バクテラント、1%酵母抽出物、3%グルコース)又はpH6.8、8種濃度希釈液(0.67%アミノ酸を含む酵母浸漬ベース、2%グルコース、1%コハク酸、0.6% NaOH、50mg/mlソニーノール)に必要な塩及びアミノ酸を加えたもの中で30℃で増殖させた。

5, secreting cells
5, frc 3-8, level 2-112, vfr 3, vfr 3-5, hie 4: Bracke, A. J. 5, 1984, Proc. Nat'l. Acad. Sci. USA, 81,

1×55℃で室温で1回洗浄した。次にフィルターを-70℃で45時間オートラジオグラフィにかけた。

サブクレンジング-エネター-Sammer, 1977, *Proc. Nat'l. Acad. Sci. U. S. A.*, 74, 5468-5471)を用いて、クロームCに由来する2,4kbのfragile-EcoRIフラグメントを完全に配列決定した。配列決定に用いた制限フラグメントを、Hollmes及びGriegleyの電泳法(J981, *Anal. Biochem.*, pp. 193-197)を用いて配列決定用に製造したプラスミドDNAとpUC59とにサブクレンジングした。更に、残りのフラグメントを一本端ベクターmp12又はmp13にクローニングした(Messing, 1983, *Methods Enzymol.*, 103, pp. 20-78)の一連の配列決定プライマー(15-18マー)を合成した。これらのプライマーは、クローニングベクターのポリリンカー領域、又は予め合成したHpaC-DNA配列にアネーリングする。プライマーのアネーリングに反応し、プラスミドDNAを、2M NaOH, 2mM EDTA中で37℃で30分間加熱し、0.1塩の3M酢酸ナトリウ

ムpH5, 0.05Mの溶液によって中和し、2巻の95%エタノールで-70℃で15分間沈降させた。[α-³²P] dATP(3000Ci/mmol; ICN)を標識に使用して、in vitroの延伸を行うために、7-DNAポリメラーゼ(Sequences, 45-51eachemicall)を製造業者の指示通りに使用した。反応を既に記述されている方法で解析した(Boscier, 1989, *Gene*, 78, pp. 323-330)。

添付例-6

RNAの製造及び解析

細胞40/40の細胞培養細胞(5×10⁶〜1×10⁷細胞/ml)又は正常細胞(2×10⁶細胞/ml)から完全RNAを製造した。30分間の熱変性(30℃〜42℃)にかけたMD40/40の細胞培養細胞からRNAを抽出した。完全RNAは、事實上のDobsonの方法(1989, *Nucleic Acids Res.*, 17, 2877-2892)に従って製造した。

ノーザンブロット解析を次のように実施した: 20%の完全RNAを20%ホルムアルデヒド、50%酢酸アン

添付例-6

pq11: H1S33対立遺伝子の標識

H1S33遺伝子を有する1,8kbのBamHIフラグメントをプラスミドpMA709から抽出させ(Montiel, 1984, 特許利用文書)、1%塩基アガロース(Sigma)上でゲルした。該フラグメントのBamHI作業者用、MamI13sの方法(1982, 特許利用文書)で、dNTPsとDNAポリメラーゼのクレノワフラグメントを用いて複製した。次にEDU1濃度の1,2kb EcoRI-BamHIフラグメントを、プラスミドpUC19のポリリンカー内のSmaI-BamHI部位にサブクレンジングした。最後に、H1S33遺伝子を含む複製したBamHIフラグメントを、EDU1コーピング領域内の単一のEcoRV部位に遷移した(第3図)。得られたdd11: H1S33対立遺伝子を3,0kbのBamI-EcoRIフラグメント上に逆転写し、塩酸点アガロース上で解析し、11kbの新規サテライト型重複領域プロモーター(1985, 特許利用文書)を用いて二塩基対AS3324をH1S33プロトタイプ

ホルムアルデヒド中で55℃で15分間加熱することにより変性し、次に5%ホルムアルデヒドを含む1%アガロースゲル中で分離した。完全RNAを真空ブロッディングでニトロセルロースフィルター(S&S, BA85)にトランスファーし、該フィルターを10mM トリス-HCl中で5分間洗浄した。ハイブリダイゼーションを、10×デンハート液、2×SSC、50mMリン酸緩衝液pH6.5、40%ホルムアルデヒド、0.1%SDS、400µg/ml熱安定化酵素DNase及び1-5nM/mlのプロボウで42℃で一晩実施した。ウォッシュを-70℃で1〜5分間オートラジオグラフィにかけた。使用したプローブは、EDU1濃度の1.2kbのH1Bd11-34フラグメント(Farquhar, 1984, 特許利用文書、2回参照)、並びにpR3322にクローニングしたS. cerevisiaeの18S及び28SリボソームRNA遺伝子の一部分を含むプラスミドsep7(Dr. F. S. Cox, University of Oxfordから入手)である。これらのプローブは、タンダムプライマー-添付例(BCL)で製造業者の指示に従って標識した。

(precofirophar)に形質転換するのに使用した。

実施例 7

1.0 ユーティリティのP.D.1アッセイ

金クタンパク質抽出物におけるP.D.1活性のアッセイを、
Hill slopeの方法(1984, Mathias & Symonol, 1.0.2, pp. 281-282)で実施した。

試薬の調製

スクランブルリボヌクレアーゼ(scrumble
frictionalase)は、ランダムに形成されたグ
ヌスフィド結合を含む完全に脱塩した混合物である。これは、市販の(Sigma)ワシントンリボヌクレアーゼAか
ら下記の方法で調製する。

リボヌクレアーゼを、50 mM トリス-HCl 緩衝液、
pH 8.6、8.9 mM 炭酸、100 mM ジチナトトリート
ル(還元可能ジスルフィド結合に対して約15倍モル過剰
なジチナトトリートル)中80 mg/ml (約2.2 mM)
で、室温で15時間〜20時間、又は55℃で1時間イン

badex Q-25から溶離することにより、スクラン
ブル脱塩を阻害する。タンパク質含有フラクションをブー
ル、1 M トリスでpH 8に調整し、4℃で貯蔵する。

この方法によるスクランブルリボヌクレアーゼの収率は
通常90〜100%である。試薬は溶液中4℃で6ヶ月
まで安定であり、あるいは、50 mM NH₄HCO₃、
pH 7.8中に過剰し、次いで凍結乾燥して、-20℃で
無期限に貯蔵し得る白色結晶状固体物としてもよい。

アッセイの手順

試薬、スクランブルリボヌクレアーゼは、約2%の炭酸
リボヌクレアーゼ活性を有する濃度でRNAの加水分解
阻害では本質的に不活性である。スクランブルリボヌクレ
アーゼ中の分子間及び分子内ジスルフィドの交換の触媒に
おけるP.D.1の作用は、天然ジスルフィド結合、天然脂質
を阻害させ、RNAに対してリボヌクレアーゼ活性を阻害
的に阻害する(cocombinant return)。このようにして、P.D.1の活性は、通常にアリコート
が採取されるタイムコース(timelapse)イン
キュベーションによってアッセイし、RNAに対するリ
ボヌクレアーゼ活性を測定する。

特許7-508881 (17)

既述阻害剤を次試験でpH 4に脱塩化し、その後には、
スクラスたり、1 M 炭酸で80 mg/ml Q-25から
スクラスすることにより、還元タンパク質を分離する。
280 nmで溶離フラクションをスクラシ、タンパク質
含有フラクションをブーリ、天然リボヌクレアーゼを標
準として用いて、タンパク質濃度を分光化学的に又は化学
的に測定する。

還元リボヌクレアーゼの試料を0.1 M 炭酸で約0.5
mg/mlに希釈する。固相試薬を最終濃度10 mMまで加
え、塩酸サルコシンを0.1 Mまで加える(サルコシンは
濃度依存的に存在するリボヌクレオンと反応する
ために加水され、カルバミル化によってリボヌクレアー
ゼを不活性化し得る)。1 M トリスでpHを8.5に調整し、
室温で2〜3時間インキュベートする。その間にタン
パク質は天然O₂によってランダムに酸化される。この
インキュベーションの後で、5' 3' 7' 4' 2' 6' 5' (2-
ニトロ安息香酸)を用いて高純度オール基を調べると、再
酸化が完了していることが判明する(リボヌクレアーゼ分
子当たり0.1以下の還元チオール)。

水溶液でpH 4に脱塩化し、0.1 M 炭酸中で80 mg

タンパク質スクラスフィードインメーザの試験を、50
mg/mlスクラシトリウム緩衝液、pH 7.5に、最終量が9
00 μlになるまで加え、10' 3' 7' 4' 2' 6' 5' ジチナトトリートル
(10 μlの1 mMストック溶液、毎日新しく調製)と共
に30℃で2〜3時間インキュベートする。トリス-
HCl 緩衝液も使用し得るが、その場合は活性が約25%
低下する。次いでアッセイを、スクランブルリボヌクレ
アーゼの100 μlのアリコート(10 mM 炭酸中0.5 mg
/mlストック溶液、毎日新しく調製)の添加により開始
し、インキュベーション混合物を30℃に維持する。より
小さい規模で操作する場合は、反応の量を1/10に減少
して、無制限アッセイ量を100 μlとし得る。100 μlのア
リコートで、5分の時点で採取し、その後2〜3分間隔
で15分まで採取して、スクランブルリボヌクレアーゼの
活性活性についてアッセイする。各アリコートは、30℃
で予め平衡化した石英キャピラリーで、0.25 mgの高
度に重合した酵母RNA(50 μlの5 mg/mlストック
溶液)を含む3 mlのDEK緩衝液(50 mM トリス-
HCl 緩衝液、pH 7.5、2.5 mM KCl、5 mM
MgCl₂)のアクセイ混合物に調製に投与する。Perk

in-1mer 350分光強度(バンド幅2.5nm)のデュアル検出モードを用いてリポヌクレアーゼ活性を30℃でモニターし、 $A_{330}/\Delta A$ に対する A_{294} の商化を測定する。 RNA 加水分解速度($\Delta A/\text{分}^{-1}$)は1.5~2分以内で一定である。この速度に応じてインキュベーションからのアキュートの採取間隔をプロットしたグラフは、15分まで直線である。時間係数(time course)の基線部分の勾配($\Delta A/\text{分}^{-1}$)を三つ読みアッセイの酵素活性で計算し(相対誤差は決まており、99である)、タンパク質スルファイドイソメラーゼ活性の測定値とする。

ジナトリウムイオンのみによるスタンプリポヌクレアーゼの非酵素的水解速度を測定するために、酵素活性を監視して対照インキュベーションを測定する。これらの速度は通常0.5 $\times 10^{-4} \Delta A/\text{分}^{-1}$ であり、酵素試料のタンパク質スルファイドイソメラーゼ活性の計算で差し引かれる。

1. 最近のタンパク質スルファイドイソメラーゼ活性は、リポヌクレアーゼ解放/併の速度でスタンプリポヌクレアーゼの活性化を触媒する量であると高橋される。

実施例 8

酵母LY82及びUR3座にアリドフラグメントを用いたためのベクターの構築

LY82での組み込みのためのベクターを下記の手順で構築した。プラスミドpUC19をHindIIIで消化し、酵母ベクターフラグメントをゲル精製した。次いでこのフラグメントをEcoRIで消化し、得られた2.7kbのEcoRI-HindIIIベクターフラグメントをゲル精製した。精製したフラグメントを下記の手順で組み立てられ、構築した:

5'-AATTCGCGCCGCAAGCTTGGCGCCGCG-3' (配列番号: 6)

3'-CGCGCGCGCTGGCAAGCTTGGCGCCGCG-3' (配列番号: 7)

酵母リポヌクレオチドは、EcoRI付着末端と、NcoI位置と、HindIII位置と、NcoI位置と、HindIII位置とをこの順序で含む。得られたプラスミドpUC-NcoIは、両端でNcoI位置に酵母フラグメントが挿入された単一のHindIII位置を含む。

UR3座に組み込むべき酵母カセットのターゲティングのためのプラスミドを下記の手順で構築した。酵母UR3座遺伝子座は、YRp10に由来する1.1kbのH

リポヌクレアーゼ単位は、1.1kbのad5orbanc座/分のA₃₃₀に対するA₂₉₄の変化を生成する量であると高橋される。

ad5orbancフラグメントであった[Yeast, S. A. 6, 1988, Yeast, J. 6, 62-188]。プラスミドpUC-NcoIをHindIIIで消化し、酵母リポヌクレオチドをゲル精製した。1.1kbのHindIII-URA3フラグメントと連結して、プラスミドpUC-NcoI-YRp10を得た。

LY82座への組み込みのためのターゲティングするためのプラスミドを下記の手順で構築した。酵母LY82遺伝子座を有するプラスミドYIp699 [Barnes, D. A. 及びThompson, J., 1986, Mol. Cell. Biol., 6, 2828-2838]をEcoRI及びHindIIIで消化し、LY82遺伝子座を有する4.5kbのEcoRI-HindIIIフラグメントを、予めEcoRI及びHindIIIで消化したpUC19にクローニングした。次いでこのプラスミドをPvuII及びBglIIで消化し、LY82遺伝子座を有する7.7kbのPvuII-BglIIフラグメントをゲル精製し、酵母変換した。プラスミドpUC-NcoIをHindIIIで消化し、酵母リポヌクレオチドをゲル精製した。酵母変換した、7

3 kbpの上流2フラグメントと連結した。最初の遺伝子を有する得られたプラスミドをpUC-MOI-LYS2 (pN1と略する) で命名した。

LYS2での組み込みのための第2のベクターも構築した。プラスミドp660をNcoIで消化し、LYS2タンパク質コーディング配列の大部分を含む3.0 kbpのNcoIフラグメントをゲル精製し、平滑化 (smooth) 処理した。プラスミドpUC13をSmaIで消化し、平滑化後、3.0 kbpのLYS2フラグメントと連結して、組み込みベクターpUC13-LYS2を得た。

実施例 9

酵母アルファ因子発リナーゲンに融合したヒトPDIを産生する細胞株の構築

ヒトPDIコーディング配列源は、Pithajani et al. (1987, 特出引用文献) によって記載されている複製部分のcDNAクローン、p210及びp1である。ヒトPDI cDNAの5'末端を有するp210に由来する、45 kbpのEcoRI-PstIフラグメントをpUC13にクローニングして、プラスミドpUC

1350を得た。次いで該プラスミドpUC1350をEcoRI及びAvaIで消化した (AvaIは既述ヒトPDIをコードする配列の第3のアミノ酸に対応する位置で切断する)。得られた3.1 kbpのベクター断片 (bacterial clone) フラグメントをゲル精製し、下記の遺伝子のオリゴヌクレオチドアダプターと連結した:

5'-AATTCCTGCGCCGCG-3' (配列番号: 8)

2'-GGTACTCGGCGGCTG-5' (配列番号: 9)

該アダプターは既述PDIコーディング配列の5'末端を再構築し、両者の分断リナーゲン配列への末端ヒトPDI配列の正確な融合を可能にするような位置にHindIII配位を含む。

次いで、得られたプラスミドpUC1350をPstIで消化し、予知シリアルカリキスファーマーゼで処理し、ヒトPDIコーディング配列の両端を含むプラスミド (Pithajani et al., 1987, 特出引用文献) に由来する1.5 kbpのPstI-PstIフラグメントと連結して、プラスミドpUC1350を得た。このプラスミドpUC1350をHindIII (前記オリゴアダプター内で切断する) で消化し、次いでHindIIIで

消化した。その結果得られた、既述ヒトPDIコーディング配列を有する1.9 kbpのHindIII-HindIIIフラグメントをゲル精製し、予めSmaI及びNcoIで消化したプラスミドpGS4にサブクローニングした (pGS4はアルファ因子遺伝子 (AFP-1) プレプロ分泌リナーゲン配列に融合した酵母GAL1プロモーターを有する: Shaw, K. J., 1988, DNA, 177-185)。平滑化後SmaI及びHindIII末の間に形成された融合部は、MfeIプレプロリナーゲン配列とヒトPDI成熟部分との間の正確なインフレーム融合を再構築する (得られたプラスミドはpUC13と命名した (第4図))。

LYS2組み込みベクターpN1 (pUC-MOI-LYS2) をSmaI及びXhoIで消化し、T4 DNAポリメラーゼでの処理によって平滑化処理した。プラスミドpUC1350をEcoRI及びHindIIIで消化し、その結果得られた、GAL1プロモーター-アルファ因子プロセッサ-ヒトPDI成熟カセットを有する2.8 kbpのEcoRI-HindIIIフラグメントをゲル精製し、T4 DNAポリメラーゼでの処理

によって平滑化処理した。前記平滑化後pN1ベクターフラグメントと該融合カセットフラグメントを混合しに連結し、該連結混合物を用いてE. coli株ATCC 55991を形質転換した。所期の構造を有するプラスミドを含むものについて形質転換体をスクリーニングし、得られたプラスミドpN1-MfeI-HPDIを多数に繁殖した。pN1-MfeI-HPDIをNcoIで消化すると、両端でLYS2 DNA配列にサブクローニングされ、2 kbpの発現カセットが得られる。消化したDNAを用いて、スファロプラスト法で (Hinnen, A. R., 1978, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 75, pp. 1929-1939), S. cerevisiae株B11955及びJRY188を形質転換した。NcoI制限はターゲティングデバイスとして作用しながら発現カセットを染色体LYS2座に同化させ、該座で発現カセットが相同置換を介して置換された。形質転換株を、アルファ1/ノブリン検査室媒体中で増殖するものについてスクリーニングした (Chakraborty, B. B., 1979, Genetics, 91, pp. 511-519; Baranovsky及びThorne, 1986, 特出

アードする。〈ATG開始コドン位置で示されている〉。得られたD、7kbpのBamH I-EcoR Vフラグメントをゲル精製し、次いで、予めEcoR V及びBamH Iで消化しておいたpMT15あるいはサブローニングして、プラスミドpUKC17Qを得た。

プラスミドpUKC189をEcoR Vで消化し、そのお母得られた、酵母PDIの所記本基部分を有する1、3kbpのEcoR V-EcoR Vフラグメントをゲル精製し、次いでpUKC17Qの制限酶EcoR V部位に挿入し、それによって制限の〈完全な〉酵母PDI (yPDI) 遺伝子を再構築した。このようにして得たプラスミドをpUKC17と命名した。

pUKC175をEcoN Iで消化し、yPDI遺伝子を有する得られた、1kbpフラグメントを単離・精製し、ゲル精製した。pUC19をSacI及びSmaIで消化し、甲殻不消化し、所記平末端化EcoN I yPDIフラグメントと連結した。制限酵素を用いてE. coli DH5細胞を感受性化した、得られた形質転換体を、pUC19ポリマーカイン内のBamH I部位がyPDIコーディング配列の3' 末端に隣接して位置されるよう

に適切な方向でyPDI挿入を有するプラスミドを含むものについてスクリーニングした。BamH Iフラグメント上のyPDI ORFの5' 末端にはbamHI部位が既に存在していたため、複製基物(pUC19-yPDIと命名)はこの時点で、1、3kbpのBamH Iフラグメント上にyPDI ORFを含む、pUC19-yPDI (をBamH Iで消化し、yPDI遺伝子を有する)、2、BamH I 3kbpフラグメントをゲル精製し、次いでベクターpUC18-GAL10p (B) ADHI1 (ストック#492) (第5図)のBamH I部位にサブローニングした。得られたプラスミドpUC18-GAL10p-yPDI-ADHI1 (第7図)はストック#1015である。プラスミドpUC18-GAL10p-yPDI-ADHI1をSmaI、SphI及びSacIで消化し、複製カセットを有する2、7kbpのSmaI-SphIフラグメントをゲル精製し、平末端化し、次いでpUKC171 (pUKC171は、予めEcoR I及びHindIIIで消化して得たpUC19にサブローニングしたY1p600 (Bayer AG及びThorne, 1986, 所出引用文献)の4、5k EcoR I-

HindIII (Y52フラグメントを含む)の制限酶SacI部位にクローニングした。得られたpUKC171-GAL10p-yPDIベクターをEcoR I及びPvuIIで消化してY52-GAL10p-yPDI-ADHI1 (Y52カセットを切離し、これを用いてE. coli SacI-SphI株JRY188及びRJY1995を形質転換した。得られたY52形質転換体を、本発明に記載のように、ゲノムDNA調製物のサブプロットにより評価した。Y522度には記されたQAL10p-yPDIカセットを有する菌株の増殖が検出された。得られた株をRJY1995/yPDI及びRJY188/yPDI (所記1152)と命名した。

形質転換 1-4

URA3座への形質転換カセットから酵母PDIを過剰産生する形質転換の検査

プラスミドpUC-Nott-URA3 (第8図)をEcoR I及びNcoIで消化してURA3遺伝子の一部分を欠失させるため、平末端化された。プラスミドpUC18-GAL10p-yPDI-ADHI1 (をEcoR I、

SacI及びSphIで消化し、GAL10p-yPDI-ADHI1を複製カセットを有する2、3kbpのEcoR I-SphIフラグメントをゲル精製し、平末端化し、所記ベクターフラグメントと連結して、プラスミドpNU-GAL10p-yPDIを得た。NcoIでの消化により、pNU-GAL10p-yPDIからURA3-GAL10p-yPDI-ADHI1-URA3超遠カセットを切り出した。得られた超遠カセットを用いて酵母株RJY107を形質転換した。5-フルオロウラシド酸含有媒体増殖上で(Scofield, 1984, Mof, Genet., 197, pp. 345)、ura⁻形質転換体を選択した。得られたura⁻形質転換体に向けるゲノムDNAをBglIIで消化し、GAL10p-yPDI-ADHI1カセット由来の放射線増殖したEcoR I-pYU11フラグメントをプローブとして用いて、サブプロットにより評価した。形質のGAL10p-yPDI-ADHI1超遠カセットをURA3に結合した阻断体が固定された。第8図K-71は、URA3に結合された阻断体のコピーを割っていた (第1138)。菌株RJY188は、URA3に結合されたコピーをつたけ

作していた（株 1137）。

参考文献 15

培養液増殖中のPDIタンパク質量の評価

酵母株を、3×YEPD液体培地で、23℃で24時間増殖させた。24時間が経過した後、培養液にガラクトースを最終濃度4.5%まで加えた。次いで培養物を23℃で更に24時間再インキュベートした。あるいは、酵母株を3×YEPDで30℃で24時間培養した。細胞を回収し、内蔵液中で洗浄し、同量の3×YEPD-ガラクトース培地に再懸濁させた。酵母液を更に16~25時間インキュベートし、その後回収し、タンパク質を抽出方法2（下記）で抽出した。

タンパク質の抽出：

本質的に（Met）100%の方法（1983, Gene, 24, pp. 1~14）に従い、ガラスビーズ摩擦法を用いて、細胞破砕物又は定常期細胞からタンパク質を抽出した。

【例1】25mMリン酸緩衝液pH7.0中のPMSEF（0.5mM）の存在で細胞壁のガラスビーズ破砕を

トリルアミドゲル及びレーン当たり10μgのローディングされたタンパク質（タンパク質抽出方法1）。抽提のゲル中では5μgを予備染色分子重量標準を使用した。ゲルはBioRad mini-Protein 11グルセスラムで操作した。タンパク質濃度を計算せずに、細胞外抽出物をレーン当たり15~20μlでローディングした。電気泳動の間、電圧は200ボルト以下に維持した。

Biochemie 半自動電気泳動システムを用いて、タンパク質をニトロセルロースにトランスファーした。ニトロセルロース膜を5%（w/v）酢酸で1時間ブロッグし、洗浄し、1:500~1:750の抗体で8時間から一夜にわたり、反応をPDIポリクローナル抗体と共にインキュベートした。膜を洗浄し、ペルオキシダーゼ反応液（サバ）をGを最終濃度1:100で調製し、インキュベーションを1時間続けた。洗浄後、Amersham ECLキットを製造無菌の洗浄液に使用して、ブロットを染色した。

最初のアッセイでは、株3072Aが分離（PDI）をウェスタンブロットで検出できるレベルで確認することが明らかになった。使用したECLプロトコルでは、検出レベルは、

特表平7-508881 (24)

行い、次いで薄層一輪スクイールにかけてタンパク質を抽出し、13.000rpmで10分間の遠心分離により可溶性タンパク質を回収した。PSE（固体）、乾燥アンセニウム（0~80%）又は粗分画濃度（<100kDa）での濃縮の両方又は、両方濃縮後の分画により最初に分画を処理した。タンパク質濃度はBradfordの方法（1976, Anal. Biochem., 72, pp. 248-254）で測定した。

【例2】方法1に従って、但し培養液にNaOH及びグルカゴンをエタノール（それぞれ最終濃度0.2M及び1%）に加え、水に約10分間浸漬し、その後TCAを最終濃度5%で加えて、粗分画液を調製した。水上で30分間静置した後、遠心分離によってタンパク質を回収し、40アセトンで洗浄し、SDS-PAGEローディング緩衝液に再懸濁させた。

50μgの全可溶性タンパク質を、本質的にSchulzの方法（1987, Gene, 24, pp. 113-23）に従って、一次発SDS-PAGE（12%トリアクリルアミド）とクマールブルー染色とで分析した。次の凝析で電気泳動を実施した。10%SDS-ポリ

0.5%の濃度のPDIであった。この分析PDIは、100kDaカットオフ限外泳動によって保持されたため、二量体であることが明らかになった。株1072Aに対応するHDEL抗体（1279）とを比較すると、ヒトPDIは100kDaから分離されていた。この実験では、最終培養/誘導条件を、増殖温度（℃）及び誘導期間について最適化した。両剤二つの株は、23℃で培養し、次いで30℃で18時間誘導するか、又は30℃で18時間増殖と誘導すると、より高いPDI合成レベルを示した。

参考文献 16

細胞内でアンチステリンを表現させるためのベクターの構築

アンチステリンは血液凝固因子Xaの強力なタンパク質阻害物質である。アンチステリン（AT5）は、メキシコヒルJaliscoense 13 of 13の硬脂酸から分離された（Nelson, B. R. 1988, J. Biol. Chem., 263, pp. 10182-10187）。その後、AT5をコードするcDNAがHahn, J. R. により分離され、特徴が説明された（1989,

表2

株	ATG/L, DGD	産物レベル
JX1100	23.5	1.0
JX1100/hSP-hPDI	24.4	0.95
JX1100/ySP-hPDI	28.4	1.11
JX1100/alpha-hPDI	77.2	2.0
JX1100/yPDI	65.1	2.54

実施例 10

1. RY188及びHDBL突然変異株とPDIを過剰
発生する間接阻によるアンチアクリン分泌の評価

K9911型菌株はRY188と、互つた異なる分泌パターンを有するHDBL突然変異株とPDIを過剰発生する形質転換株とを過剰例17に記述のように増殖し、最適化増殖上清を、実施例17に記述のように固相X線検出アッセイで分泌ATGレベルについて評価した。結果は表3に示す。

表3

株	ATG(mg/L)	ADGD	ATG/ADGD
K91107 A1	0.314	23.9	0.013
K91107 A2	0.244	24.3	0.010
K91107 A3	0.334	29.5	0.013
K-Y1 A1	1.146	24.9	0.047
K-Y1 A2	1.449	21.9	0.067
K-Y1 A3	1.493	25.3	0.059
K-Y3 A1	3.656	39.0	0.099
K-Y3 A2	2.144	31.2	0.062
K-Y3 A3	1.929	43.0	0.040

K-Y1は、UR A3に多量コピ-GAL- γ PDIを有するKH Y107である。

K-Y2は、UR A3に低コピ-GAL- γ PDIを有するKH Y107である。

表3

株	ATG/L, DGD	産物レベル
JX1100	10.0	1.0
JX1100/hSP-hPDI(MDEL)	27.5	1.53
JX1100/ySP-hPDI(MDEL)	29.3	1.63
JX1100/alpha-hPDI(MDEL)	73.1	1.74

実施例 10

株とKH Y107及びHDBLを過剰発生する株と
によるアンチアクリン分泌の評価

K9911型菌株KH Y107と、突然変異株PDIを過剰発生する株の形質転換株とを増殖し、最適化増殖上清を、実施例17に記述のように固相X線検出アッセイで分泌ATGレベルについて評価した。結果は表4に要約して示す。

A1、A2及びA3は、平行して評価した異なる株の種々のクローン菌株を有する。

株PDIの過剰発生の結果、菌株はK-Y3-A1の過剰は、ATG活性の分泌が細胞当たりベースで4倍に増加し、培養ベースで約9倍の分泌が観察される。

実施例 20

多量コピ-プラスミドから解離したHDBLを過
剰発生する株と増殖上清の評価

多量コピ-解離シットルベクターYBP24(B00181e1a, D. G. 1970, Gene. 8, pp. 17-24)は、酵母2ミクロンDNA複製起点と、ウラシル阻害剤耐性遺伝子を含む。YBP24をBamHIで消化し、得られた7.8 kbpのBamHIベクターフラグメントをゲル増殖した(フラグメントa)。プラスミドB00181-GAL10-PYD1-ADH1(#1015)をEcoRI、SphI及びEcoIで消化した。その結果得られた、A111自ル-YPD1-ADH1(増殖カセット)を有する2.8 kbpのEcoRI-SphIフラグメントをゲル増殖した(フラグメントb)。プラスミドB00181

を 5'GCGAT 及び 3'ATGCTTT で構成し、GATCTP—MTFAT プレローダー—ヒト PD1 発現カセットを有する 2、8 kbp の 5'GCGAT—3'ATGCTTT フラグメントをゲル精製した (フラグメント c)。前述二つのフラグメントを平末端重合し、次いで下記の表で互いに連結した: (1) ベクターフラグメント a 及びフラグメント b を互いに連結してプラスミド 2p24-GAL10p-pPD1 (第 9 図) を得る; (2) ベクターフラグメント a 及びフラグメント c を互いに連結してプラスミド 2p24-GAL10p-MFAT-pPD1 (第 10 図) を得る。得られた新記二つのプラスミド DNA の大規模 CeCl₃ 製造を行った。二つの新記の形質転換細胞で、酵母株 RY188 を AT5 高発ベクター K891 (発現例 16) 及び 2p24-GAL10p-pPD1 を用いて RY188 及び 2p24-GAL10p-MFAT-pPD1 で同様に形質転換した。両方のプラスミドを含む形質転換株を、ロシジン及びウラシルの両方を欠失した合成培地で選択し、単離した株 Joseph cellon を同一培地で再スクリーニングしてクローン純株を単離した。二つの元の同形別異株の各々について 5 個の制限クローン断片を、培養管内の

5 ml の 3xTYE 培地に接種し、縮減培養ローラードラムで 23℃ で 24 時間インキュベートした。24 時間が経過した後、ガラクトースを最終濃度 4、8% で加え、培養物を 23℃ で更に 5 日間インキュベートした。逐次分画によって断片を回収し、清化処理した断片を 2xSSA 電気泳動で AT5 高発レベルについてアッセイした。 2p24-GAL10p-pPD1 プラスミド及び AT5 高発ベクターを含む同形別異株は、AT5 高発ベクターのみを含む株 RY188 と比べて、AT5 高発レベルに対して 2 倍の AT5 高発レベルを示した。 2p24-GAL10p-MFAT-pPD1 プラスミド及び AT5 高発ベクターを含む同形別異株は、AT5 高発ベクターのみを含む株 RY188 と比べて、2~3 倍の AT5 高発レベルを示した。

実施例 23

5'GCGAT 及び 3'ATGCTTT を用いた同形別異ベクターから製造された PD1 を発現させる酵母菌株の増殖及び分析

5'GCGAT 及び 3'ATGCTTT を用いた同形別異ベクター

断片を、分岐型 (divergent) GATCTP 及び GATCTP プロモーターとこれら二つのプロモーターの TAT エンターの間に位置する共通 GATCTP 結合ドメインを含む二つの逆転写因子間の領域から分岐的に (divergently) 転写した。プラスミド 2p24-GATCTP (Johnson, M. 及び Davis, R., 1984, Mol. Cell Biol., 4, pp. 1440) は、この分岐型 GATCTP—GATCTP プロモーターを、85 kbp の 5'GCGAT—3'ATGCTTT フラグメント上にある 3'ATGCTTT 部位に挿入した内部 2p24 断片を有する。このプロモーターフラグメントを使用して、同形別異プロモーターカセットベクター pUC-GATCTP を構築した。該ベクターは次の特徴を有する: 複製原 6'GCGAT 及び 3'GATCTP 部位により、この順序で、酵母 ADHI 転写ターミレーター (0、35 kbp HI 及び 11-3.6 フラグメント) から分離した酵母 GATCTP プロモーター、非複製 2p24 及び 3'ATGCTTT 部位により ADHI 転写ターミレーター (0、35 kbp HI 及び 11-3.6 フラグメント) から分離した酵母 GATCTP プロモーター。二つの ADHI ターミレーターエレメントの 3' 末端は、分岐型プロモーター

発現カセット全体を 2p24 フラグメントとして構築できるように、3'ATGCTTT 部位によってランニングされている。このプラスミド内のベクター変換は、ポリリンカーの代わりに制限酵素カセットを有する pUC18 である。

プラスミド pUC-GATCTP を RY188 で構成し、ゲル精製してフラグメント a を形成した。プラスミド pUC18 を 2p24 で構成し、成熟ヒト PD1 コーディング配列にインフレーム融合した ALF 因子プレローダーを有する 1、9 kbp の 2p24 フラグメントをゲル精製し、ベクターフラグメント a に連結して、プラスミド pUC-GATCTP/10-hPD1 を得た。該プラスミドでは、ALF 因子プレローダー 2p24 融合が GATCTP プロモーターの制御下にある。プラスミド pUC18-GATCTP-pPD1-ADHI (発現例 13) を 2p24 で構成し、その結果得られた、酵母 PD1 コーディング配列を有する 1、7 kbp の 2p24 フラグメントをゲル精製し、次いでベクターフラグメント a に連結して、プラスミド pUC-GATCTP/10-pPD1 を得た。該プラスミドでは、GATCTP プロモーターが酵母 PD1 の発現を制御する。このようにして得た二つのプ

ラスミドをS.c.R.Iで消化し、平滑液調化し、それぞれ $hPD1$ 及び $yPD1$ のカセットを有するベクタープラグメントに組みこまれた。

A.T.S. 発現ベクター (KH91) を S.g.I 及び B.g.I で消化し、成熟 A.T.S. のローディング配列にインフレーム融合したアルファ因子プロテオリナーを有する S.g.I - B.g.I のプラグメントをゲル精製し、平滑液調化し、閉鎖の反応で二つの平滑液調化ベクタープラグメント及び c に連結した。閉鎖反応で調べて正確な調化を有する得られたプラスミドを、それぞれ $pUC-GAL1/10-hPD1/AT.S$ (第 1 図) 及び $pUC-GAL1/10-yPD1/AT.S$ (第 2 図) で消化した。これら二つのプラスミドを S.p.h.I で消化して発現カセットを産生させ、 $hPD1$ 関連又は $yPD1$ 関連調化カセットを有するプラグメントを、平め S.p.h.I で消化した調化シトルベクター $pC1/1(Rossenberger, S. R., 1984, Nature, 312, 29, 77-80)$ と連結した。9 月以降、二つのプラスミド、 $pC1/1-GAL1/10-hPD1/AT.S$ 及び $pC1/1-GAL1/10-yPD1/AT.S$ が得られた。これらのプラス

ミドでは、A.T.S. 及び PDI 関連発現カセットが、それぞれ GAL1 及び GAL1 プロモーターの制御下で同一のポリペプチド上に存在していた。

次いでこれら二つの発現ベクターを用いて、酵母株 $RY188$ 、 $R.Y.189$ 及び他の適合な酵母宿主株を培養転換した。培養転換株をロイシン補給含有培地で選択し、得られた形質転換株を、上記調化例に照準のように、A.T.S. 及び PDI の発現/分認について検証した。

表 5 (下記) に示す結果から明かなように、 $hPD1$ を過剰発現する菌株は、 $pKH4$ 2/AT.S のみを含有対照株と比べて数倍高いレベルのアナスタシンを分泌する。また、酵母 PDI を過剰発現する菌株は、対照株と比べて 3~17 倍高いレベルのアナスタシンを分泌した。

表 5

表 5 (2)

調化株		アナスタシン (ng/L)	
<u>pC1/1-GAL1/10-hPD1/AT.S</u>			
対照株	1	4.2	
対照株	2	3.3	
対照株	3	3.9	
対照株	4	4.6	
対照株	5	5.1	
<u>pC1/1-GAL1/10-yPD1/AT.S</u>			
対照株	1	3.9	
対照株	2	11.7	
対照株	3	3.8	
高濃度調化			
対照株	4	26.0	
対照株	5	8.1	
JKT168	対照	1.5	

※ 28℃で培養後 5 日目の収率。

PDI 過剰発現菌株によるアナスタシン分泌の発現に對する調査の結果

アナスタシン発現ベクター $pKH4$ 2/AT.S 及び $YEp24-GAL1-p-MF\alpha-hPD1$ もしくは $YEp24-GAL110-yPD1$ で同時形質転換した株 $RY188$ の選択した菌株を、23℃又は 30℃での培養調化にアナスタシン分泌について調査した。アナスタシン発現ベクターのみで形質転換した菌株 $RY188$ を基準として増殖した。3 x $YEp24$ 培地で 23℃又は 30℃で一度培養した後、カクタースを最終濃度 4、8% で加えて増殖培地物を調化し、23℃又は 30℃の適当な温度で更に 5 日間増殖した。培養後 3~5 日で採取した増殖物を、四子 X a 超音波サイザーにより分泌アナスタシンレベルについて測定した。表 6 の結果から明かなように、アナスタシン産量は、 PDI を過剰発現する株の菌株について、培養後 3 日目及び 5 日目の間で、濃度を 30℃にした時よりも 23℃にした時の方が高かった。

表6

制限酵素	長さ (bp)	アンカスタン(%)	
		制限	制限
BstI-1	23	0.63	2.11
BstI-2	23	1.14	2.68
PstI-1	13	5.93	19.23
PstI-2	23	3.90	15.12
JRI159 制限	23	0.38	0.65
BstI-1	30	0.49	0.47
BstI-2	20	0.42	0.47
PstI-1	30	2.29	4.65
PstI-2	30	2.71	2.16
JRI159 制限	30	0.34	0.30

* 種々のλPDI制限法は、アンカスタン制限ベクターX99I及びYBp24-GALIp-MFp-hPDIの両方をとんでいた。YPDI制限法は、ベクターX99I及びYBp24-GALIp-MFp-hPDIの両方をとんでいた。

TAPをコードする合成遺伝子にインフレーム融合した真価(authentic)MFpIプレプロセッサー配列を含む第2のTAP複製ベクターpKH4-3B/TAPを構築した。合成TAP遺伝子を含むプラスミドpKH4-TAP(Neopar, 1990, 謝出引用文献)を、合成TAP遺伝子の5'末端及び3'末端をそれぞれ改造するために、下記の二つのオリゴヌクレオチドプライマー

5'-TACGGCGGCG TGGCTCAAG-3' (配列番号: 20) 及び
5'-ACTGGATGCC AATCAAGCT TGGTGCAGG CCG-3' (配列番号: 21)

を用いるポリマー化連鎖反応(PCR)で、DNA断片として産出した。

該PCR反応は、当業者に広く知られている方法(Jin et al., M. A., 編, 1990, PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications, Academic Press, Inc., San Diego, CA)で実施した。得られたPCR産物を74ポリヌクレオチドキナーゼで5'末端化し、BamHIで消化し、次いでゲル電気泳動し、TAP

図表 23

PDIを産出する細胞に融合したマダニ細胞系

プラド(TAP)の分析

マダニ細胞系プラド(TAP)は、血液凝固因子Xaの強力な高選択性阻害剤である(Wassman, L., G., 1990, Science, 248, pp. 502-506)。TAPはマダニ細胞系プラドから単離された新規のセリンプロテアーゼ阻害剤である。TAPは、6位のコンステイン残基を含む90残のアミノ酸からなる(Wassman, 1990, 謝出引用文献)。TAPは、ガラクトース糖基化Glu110プロモーターと、TAPをコードする合成遺伝子にインフレーム融合した真価MFpIプレプロセッサー配列を含む複製ベクターpKH4-TAPを用いて、無菌内で発現させた(Neopar, M., G., 1990, J. Biol. Chem., 265, pp. 17746-17752)。このベクターは、プレプロセッサーのアミノ酸99の位置に改造されたBamHIクロモニング部位の存在に起因して、少し改造されたMFpIプレプロセッサー配列を含む(Neopar, 1990, 謝出引用文献)。

APコーディング配列の5'末端に乳糖発現を許し、この制限酵素コドン3'側に付着BamHI末脚を有する、0.2 kbのプラントBamHIフラグメントを得た。

ベクターpKH4-3B(Neopar, K., 及びScullis, L. D., 1991, Gene, 101, pp. 105-111)は、MFpIプレプロセッサーコーディング配列の2'末端に5'末端3'末端を含む。pKH4-3BをBamHIで消化し、TAP DNAポリメラーゼで処理して乳糖末端化し、BamHIで消化した。得られたプラントBamHIベクターフラグメントをゲル電気泳動し、約2 kbのプラントBamHI TAPフラグメントに連結して、ベクターpKH4-3B/TAPを得た。

別様の形質転換反応で、細胞株J1996、JRY258及びU96、ベクターYBp24-GALIp-MFpI及びpKH4-TAPもしくはpKH4-3B/TAPで同時形質転換した。両方のプラスミドを含む同時形質転換を、ロイシン及びラシリンの両方を欠失した合成培地で選択し、単離した菌株を同一培地で増殖し、

ータして、クロン単離株を選別した。選々のベクターノ
 特異同時形質転換の各々について三つの前記クロン単離
 株を、培養管内の3m lの4割グルコース含有ウラルスル
 分改質E. coli 株に(E. coli 株)に接種し
 た。接種菌物を細菌培養ローラードラム内で30℃で24
 時間インキュベートした。24時間が経過した後、細胞を
 遠心分離によって回収し、4%ガラクトースを含む50 ml
 の5×10⁸ cfu/g 培地に懸濁させた。得られた培養
 物を30℃で更に48時間インキュベートした。次いで細
 胞を遠心分離によって回収し、凍結化培地試料をSC E-
 H P L C又は因子Xの脱着アッセイにより分離してA Pレ
 ベルについて評価した(Waxman, 1990, 特許引
 用文書)。別の方法として、細胞大腸菌細胞を23℃で2
 4時間増殖し、ガラクトースを最終濃度4%で加えること
 により誘導し、次いで23℃で更に5日間インキュベート
 した。次いで、凍結化培地試料を前記のように分離してA P
 レベルについて評価した。

配列番号: 3

配列の長さ: 6 アミノ酸

配列の型: アミノ酸

塩の数: 一本鎖

トポロジー: 直線状

配列の種類: ペプチド

配列

Trp Cys Gly Pro Cys Lys
1 5

配列番号: 4

配列の長さ: 10 アミノ酸

配列の型: アミノ酸

塩の数: 一本鎖

トポロジー: 直線状

配列の種類: ペプチド

配列

Phe Tyr Ala Pro Trp Cys Gly His Cys Lys
1 5 10

配列番号: 5

【配列表】

配列番号: 1

配列の長さ: 6 アミノ酸

配列の型: アミノ酸

塩の数: 一本鎖

トポロジー: 直線状

配列の種類: ペプチド

配列

Trp Cys Gly His Cys Lys
1 5

配列番号: 2

配列の長さ: 4 アミノ酸

配列の型: アミノ酸

塩の数: 一本鎖

トポロジー: 直線状

配列の種類: ペプチド

配列

His Asp Gly Leu
1

配列の長さ: 30塩基対

配列の型: 核酸

塩の数: 一本鎖

トポロジー: 直線状

配列の種類: cDNA

配列

CTTACATGTA CCACACCATG CAGCCTAGAA 36

配列番号: 6

配列の長さ: 25塩基対

配列の型: 核酸

塩の数: 一本鎖

トポロジー: 直線状

配列の種類: cDNA

配列

AATTGCGGCG GCAAGCTTGG GCGCGC 28

配列番号: 7

配列の長さ: 26塩基対

配列の型: 核酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：cDNA

配列

AGCTGGGGCC GCAAGCTTGC GGGGGC

28

配列番号：3

配列の長さ：13塩基対

配列の型：複製

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：cDNA

配列

AATTCCTTCA GGGCC

13

配列番号：9

配列の長さ：15塩基対

配列の型：複製

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：cDNA

配列

TGAGGGGCT GGGGGGAG GGGGGGAG GGGGGGAG GGGGGGAG GGGGGGAG 40
ATTGCTTCT GTC 73

配列番号：12

配列の長さ：88塩基対

配列の型：複製

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：cDNA

配列

GAGGAGAAA AGAAGATGAA GTTCTTCTCT GGGGGGAG GGGGGGAG GGGGGGAG 40
GAGGGGAG GGGGGGAG GGGGGGAG 88

配列番号：13

配列の長さ：88塩基対

配列の型：複製

配列の種類：cDNA

配列

TCCGGGGGCT CAGCC

16

配列番号：10

配列の長さ：73塩基対

配列の型：複製

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：cDNA

配列

GATCGAGAA AGAAGATGAA GGGGGGAG GGGGGGAG GGGGGGAG GGGGGGAG 40
GGGGGAG GTC 73

配列番号：11

配列の長さ：73塩基対

配列の型：複製

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：cDNA

配列

TGGGGGCTT CCGCGAAG AGAAGATGAA AGAAGATGAA AGAAGATGAA GAGGGGAG 40
GAGGGGAG AGAAGATGAA GTTCTTCT 80

配列番号：14

配列の長さ：91塩基対

配列の型：複製

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：cDNA

配列

GAGGGGCTT AGAAGATGAA AGAAGATGAA GAGGGGAG GAGGGGAG GAGGGGAG 40
AGAAGATGAA AGAAGATGAA GAGGGGAG 91

配列番号：15

配列の長さ: 95塩基対

配列の型: 未知

塩の数: 一本鎖

トポロジー: 直線状

配列の種類: cDNA

配列

ATTGGGATG CTGAGATGG ATGAGGACGA GCGGCGGAT CATGAGCTG
CTGGGATGC GCTGGGCTG GTTGGGAGG GTTGGGAGG TGGG

90
95

配列番号: 16

配列の長さ: 81塩基対

配列の型: 未知

塩の数: 一本鎖

トポロジー: 直線状

配列の種類: cDNA

配列

GATCCAGAA ACAAGATGA GTTTCTGCT G

31

配列番号: 17

配列の型: 未知

塩の数: 一本鎖

トポロジー: 直線状

配列の種類: cDNA

配列

TATAGGATCC TTAGGATAG CTTGGGATGA GCTT

24

配列番号: 20

配列の長さ: 20塩基対

配列の型: 未知

塩の数: 一本鎖

トポロジー: 直線状

配列の種類: cDNA

配列

TTCACGCTG TCTGATCAG

20

配列番号: 21

配列の長さ: 35塩基対

配列の型: 未知

塩の数: 一本鎖

配列の長さ: 31塩基対

配列の型: 未知

塩の数: 一本鎖

トポロジー: 直線状

配列の種類: cDNA

配列

GCACCAAGAG AATACCTGAT TTGTGTTTG G

31

配列番号: 18

配列の長さ: 51塩基対

配列の型: 未知

塩の数: 一本鎖

トポロジー: 直線状

配列の種類: cDNA

配列

AAAGGATGG TGGCTTGGG TAGAGGCAA GCGAGTTG GCGGAGGTT G

31

配列番号: 19

配列の長さ: 33塩基対

トポロジー: 直線状

配列の種類: cDNA

配列

CTTGATGCG AATTCATGCT TATATGCAAG CGT

33

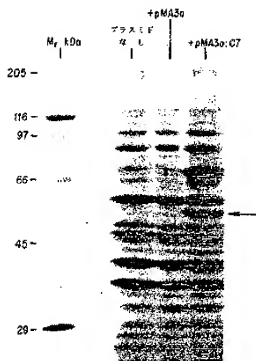


FIG. 1

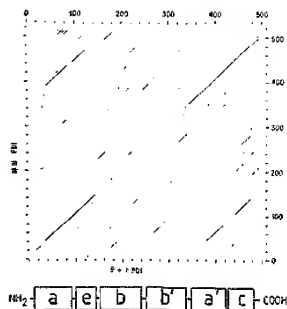


FIG. 2

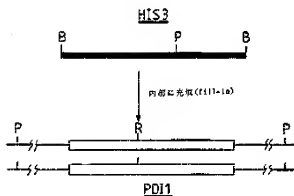


FIG. 3a



FIG. 3b

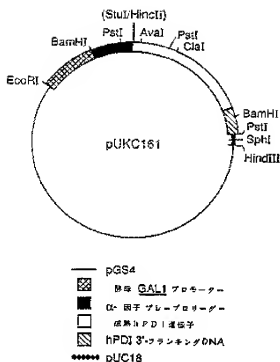


FIG. 4

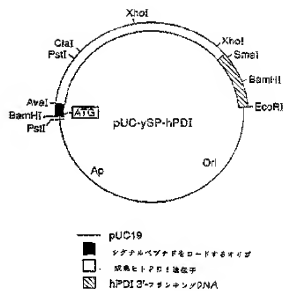


FIG. 5

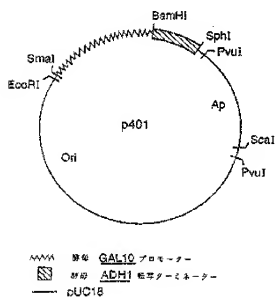


FIG. 6

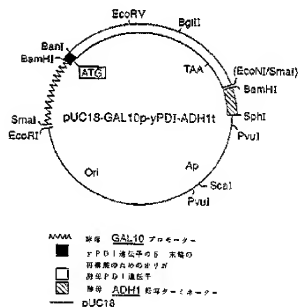


FIG. 7

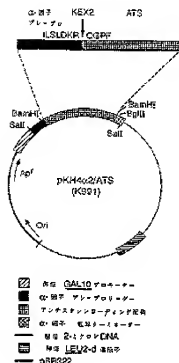


FIG. 8

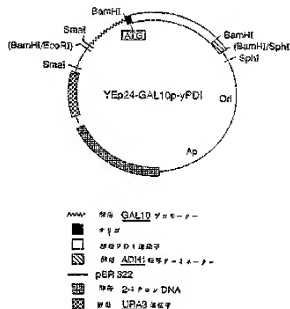


FIG. 9

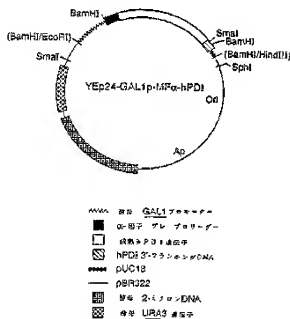


FIG. 10

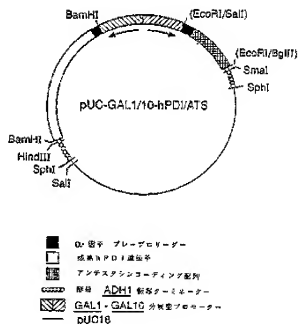


FIG. 11

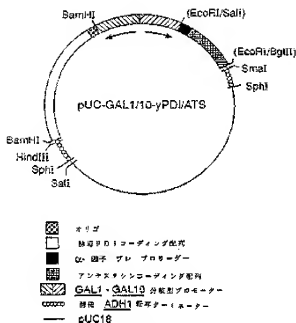


FIG. 12

[illegible]

圖書集成		Documental Collection
C. Generalia. D. Medicine. E. Agriculture. F. Industry. G. Commerce. H. Law. I. History. J. Geography. K. Literature. L. Science. M. Arts. N. Music. O. Games. P. Miscellaneous.		Reference Collection
Y	Yam, Vol. 7, Issue 1999, Summary of a, "Characteristics of the structure of the gene TCT231 gene located on chromosome III, similarity with the human TCT231 gene and the gene product of other species", pages 183-190. See same issue.	106
Y	YB, A. 826-937 (Yugoslavia) in 1997-1998. See volumes 3 and 4 especially.	9
Y	The BUKHO Journal, Vol. 6, No. 3, November 1997, "Analysis of the use of the term 'environment' in the scientific literature", pages 18-22.	17, 18, 21, 22.
Y	Yam, Vol. 7, Issue 1999, Item 10, "Testing and expression of ERM4 enzyme-enzyme, a non-enzymatic amino acid-enzyme and non-enzymatic properties", pages 47-57. See pages 47 and 57 especially.	34, 30
Y	The Journal of Biological Chemistry, Vol. 265, No. 26, issued 18 October 1990, Item 10, "Characterization of non-enzymatic amino acid-enzyme and non-enzymatic properties", pages 47-57. See pages 47 and 57 especially.	15, 11

フロントページの続き

(51) Int. Cl.⁶

識別記号

序内整理番号

F I

//C12P 21/02

C12R 1:865)

(C12N 1/16

C12R 1:865)

(C12N 9/90

C12R 1:865)

(81) 指定国

EP(AT, BE, CH, DE,

DK, ES, FR, GB, GR, IE, IT, LU, M

C, NL, PT, SE), OA(BF, BJ, CF, CG

, CI, CM, GA, GN, ML, MR, NE, SN,

TD, TG), AU, BB, BG, BR, CA, CZ,

FI, HU, JP, KR, KZ, LK, MG, MN, M

W, NO, NZ, PL, RO, RU, SD, SK, UA

, US

(72) 発明者 トウエート、マイケル・エフ

イギリス国、セント・シー・テュー・4・

7・エヌ・ビー、チャータム・ハツチ、ナ

イティンゲイル・クロース・3

(72) 発明者 フリードマン、ロバート・ビー

イギリス国、セント・シー・テュー・1・

1・エックス・アール、カンダバリー、セ

ント・オーガスティンズ・ロード・43

(72) 発明者

シムルツ、ローレン・デュー

アメリカ合衆国、ペンシルバニア・19438,

ハーリーズビル、オーク・ドライブ・421

(72) 発明者

エリス、ロナルド・ダブリュ

アメリカ合衆国、ペンシルバニア・19066,

メリオン、シカモア・アベニュー・206

(72) 発明者

マークス、ヘンリー・ゼット

アメリカ合衆国、ペンシルバニア・19095,

ウインコート、ソーンベリー・ロード・

1517

(72) 発明者 モンゴメリー、ドナ・エル

アメリカ合衆国、ペンシルバニア・18914,

チャルファント、ヒツコリー・レーン・9